

КОМИТЕТ ПО ЗДРАВООХРАНЕНИЮ МИНГОРИСПОЛКОМА
ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«МИНСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР
ХИРУРГИИ, ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ГЕМАТОЛОГИИ»

УДК616.36-089.843-089.168.1-06-037-08

ЩЕРБА
Алексей Евгеньевич

**ПРОГНОЗИРОВАНИЕ И КОМПЛЕКСНОЕ ЛЕЧЕНИЕ
ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОЙ ДИСФУНКЦИИ
ТРАНСПЛАНТАТОВ ПЕЧЕНИ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

по специальности 14.01.24 – трансплантология
и искусственные органы

Минск, 2018

Научная работа выполнена в государственном учреждении образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования».

Научный консультант:	Руммо Олег Олегович , доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси, и.о. директора государственного учреждения «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии»
Официальные оппоненты:	Богдан Василий Генрихович , доктор медицинских наук, профессор, начальник военно-медицинского факультета – профессор в учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет» Щастный Анатолий Тадеушевич , доктор медицинских наук, профессор, ректор учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» Гранов Дмитрий Анатольевич , доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, научный руководитель ФБГУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Оппонирующая организация:	Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»

Защита состоится 26.09.2018 в 13:00 часов на заседании совета по защите диссертаций Д 03.03.01 при государственном учреждении «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии» по адресу: 220045, г. Минск, ул. Семашко, 8, телефон: (8-017) 277-20-18, e-mail: iskrov@m9gkb.by

С диссертацией можно ознакомиться в Республиканской научной медицинской библиотеке.

Автореферат разослан «24» августа 2018 г.

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций



И.А. Искров

ВВЕДЕНИЕ

Проблема лечения пациентов с терминальными стадиями приобретенных хронических диффузных и врожденных метаболических заболеваний печени, первичных и вторичных опухолевых поражений гепатобилиарной системы, а также врожденных аномалий желчевыводящих протоков на протяжении последних десятилетий остается одной из самых актуальных в современной хирургии органов брюшной полости. От этих заболеваний в мире ежегодно умирает несколько миллионов человек трудоспособного возраста (Руммо О.О., 2015; Alvarez С.М. и соавт., 2017; Peery A.F. и соавт., 2017).

Трансплантация печени (ТП) является единственным эффективным методом и стандартом лечения хронических заболеваний печени в терминальной стадии, острой печеночной недостаточности и ряда первичных и метастатических опухолей печени (Руммо О.О., 2015; Starzl Т.Е. и соавт., 1982; Tat F.S., 2011; Neuberger J. и соавт., 2013; Busutil R.W., 2015).

Несмотря на стандартизацию техники операции и прогресс анестезиологических и реанимационных технологий, а также достижения в иммунологии, в трансплантации органов остается ряд нерешенных проблем. Особое место среди осложнений ТП занимает послеоперационная дисфункция аллографта в ранний период. Дисфункция трансплантата является результатом влияния факторов риска со стороны донора и реципиента, отражает баланс между экономической и клинической эффективностью операции и определяет прогноз жизни пациента в целом (Руммо О.О., 2014; Deschenes M. и соавт., 1998; Nemes B. и соавт., 2010).

С клинической точки зрения ранняя дисфункция трансплантата (РДТ) печени характеризуется замедленным восстановлением показателей гемостаза и гемодинамики с потребностью в инотропной и вазопрессорной поддержке, отсроченным разрешением энцефалопатии и замедленным восстановлением уровня международного нормализованного отношения, ростом концентрации аминотрансфераз (АСТ, АЛТ) в течение первых 24–48 ч после реперфузии трансплантата и может иметь как обратимый характер с умеренной гипербилирубинемией, так и фатальное течение с энцефалопатией, коагулопатией и лактат-ацидозом (Ahmad J. и соавт., 2014).

Причинами развития РДТ могут быть технические факторы (тромбоз и окклюзия печеночной артерии, воротной вены и печеночных вен) и факторы, не связанные с техническими особенностями и сосудистыми осложнениями операции (Руммо О.О. и соавт. 2011; Piardi T. и соавт., 2016). В центре внимания настоящего исследования находится РДТ, не имеющая технических и сосудистых причин (Olthoff K.M. и соавт., 2010; Razonable R.R. и соавт., 2011; Salvalaggio P.R. и соавт., 2012). В основе данного осложнения

трансплантации печени лежит ишемически-реперфузионное повреждение (ИРП), которое является неизбежным следствием любой ТП и представляет собой результат последовательного высвобождения активированных форм кислорода, ассоциированных с повреждением гепатоцитов, молекулярных паттернов, таких как ядерный негистоновый белок HMGB1, стимуляции паттерн-распознающих толл-подобных рецепторов-4 (TLR-4) и обусловленной ею активации клеток Купфера, эндотелиоцитов, системы комплимента и секреции цитокинов (Jaeschke H. и соавт., 1991; G. Trinchieri и соавт., 2007; X. Wang X. и соавт., 2013). Результатом ИРП является клеточное повреждение и печеночная недостаточность, что в конечном счете ведет к снижению эффективности ТП в целом (Eltzschig H.K. и соавт., 2011; Peralta C. и соавт., 2013). Известные факторы риска РДТ относятся по своей сути к эмпирическим и фенотипическим (донорские факторы, факторы реципиента, фактор времени и температуры консервации), однако проблема предупреждения и лечения нарушения функции трансплантата не решена, а ограничение степени ИРП и прогнозирование функции аллографта стали неотъемлемой задачей послеоперационного периода (Цой Д.Л. и соавт., 2013). В этой связи основными нерешенными вопросами и направлениями поиска исследований в отношении РДТ в мире сейчас являются уменьшение повреждения графта, продление безопасного срока консервации и прогнозирование ранней дисфункции трансплантата печени (Dutcowsky P., 2016). Таким образом, проблема прогнозирования и лечения послеоперационной дисфункции трансплантата отражает современные тенденции исследований в трансплантологии в мире, актуальна, однако в настоящее время недостаточно изучена.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами (проектами), темами

Тема диссертации соответствует приоритетным направлениям научных исследований и научно-технической деятельности: пп. 4.6 и 4.7 «Перечня приоритетных направлений фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2006–2010 годы», пп. 2.7 и 4.4 «Перечня приоритетных направлений научных исследований Республики Беларусь на 2011–2015 годы», п. 4 «Перечня приоритетных направлений научных исследований Республики Беларусь на 2016–2020 годы», утвержденных постановлениями Совета Министров Республики Беларусь № 512 от 17.05.2005, № 585 от 19.04.2010, № 190 от 12.03.2015 соответственно; п. 3 «Перечня приоритетных направлений научно-технической деятельности в Республике Беларусь на 2006–2010 годы», п. 23

«Перечня приоритетных направлений научно-технической деятельности в Республике Беларусь на 2011–2015 годы», п. 4 «Перечня приоритетных направлений научно-технической деятельности в Республике Беларусь на 2016–2020 годы», утвержденных Указами Президента Республики Беларусь № 315 от 06.07.2005, № 378 от 22.07.2010, № 166 от 22.04.2015 соответственно.

Диссертационное исследование выполнено в рамках научно-исследовательских работ: «Разработать и внедрить комплекс лечебных технологий, направленных на улучшение послеоперационной функции маргинальных трансплантатов печени» (ГНТП «Новые технологии диагностики и лечения», № государственной регистрации 20110065, срок выполнения: 2010–2015 гг.); «Разработать и внедрить комплексную методику прогнозирования и диагностики ранней дисфункции и отторжения трансплантатов печени на основе клинических, молекулярно-генетических, серологических и иммуногистохимических факторов» (ГНТП «Новые технологии диагностики, лечения и профилактики», № государственной регистрации 20141766, срок выполнения 2014–2017 гг.).

Цель и задачи исследования

Цель: улучшить результаты трансплантации печени путем разработки и внедрения комплекса технологий, направленных на прогнозирование, предупреждение и коррекцию ранней дисфункции пересаженного органа.

Задачи исследования

1. Определить роль и диагностическую значимость серологических и иммуногистохимических (ИГХ) прогностических маркеров ранней дисфункции трансплантата печени.
2. Оценить полиморфизм гена толл-подобного рецептора-4 и его прогностическую роль в развитии и прогрессировании ранней дисфункции трансплантата печени.
3. Разработать новые методы фармакологического прекондиционирования донора и аллогraftа и оценить их эффективность в предупреждении развития ранней дисфункции печеночного трансплантата.
4. Разработать новые эффективные методы фармакопротекции аллогraftа печени на этапе подготовки к трансплантации.
5. Установить оптимальный вариант реперфузии трансплантата печени, способствующий минимизации его ишемически-реперфузионного повреждения.

Научная новизна

Впервые определена прогностическая значимость иммуногистохимических и серологических маркеров развития ранней дисфункции

трансплантатов печени, установившая, что экспрессия ядерного негистонового белка HMGB1 в ткани печени донора, экспрессия регулятора транскрипции клеточного ответа на гипоксию фактора HIF-1 α , количество CD68+-клеток в постреперфузионном биоптате трансплантата печени и пороговая концентрация гепатоцитарного фактора роста в воротной вене через 2 ч после портальной реперфузии являются иммуногистохимическими и серологическими предикторами ранней дисфункции трансплантатов печени.

Впервые установлена патогенетическая роль полиморфизма гена паттерн-распознающего толл-подобного рецептора-4 в локусе rs913930 в развитии ранней дисфункции трансплантата печени и доказано, что генотипы гена, содержащие минорную аллель C, ассоциированы с риском развития тяжелой формы дисфункции аллографта, что обуславливает генетическую детерминированность данного осложнения.

Впервые показано, что реализация генетической детерминированности риска ранней дисфункции трансплантата включает экспрессию ядерного белка HMGB1, экспрессию CD68 в клетках печени доноров и внутрипеченочную секрецию ИЛ-23 через 1 ч после портальной реперфузии трансплантата, которые предшествуют клинической картине тяжелой формы ранней дисфункции трансплантата.

Выявлено, что фармакологическое прекондиционирование маргинальных доноров ингаляционным анестетиком севофлуран и интрапортальное введение донору антиоксиданта ацетилцистеин уменьшает выраженность ишемически-реперфузионного повреждения печени донора. Впервые разработан и внедрен метод прекондиционирования донора со смертью мозга ингаляционным анестетиком севофлуран, способствующий уменьшению частоты развития ранней дисфункции трансплантатов печени с макровезикулярным стеатозом.

Определено, что применение перфузии печени консервирующим раствором НТК и альбумином, содержащими такролимус, через воротную вену и печеночную артерию во время подготовки донорской печени к трансплантации является эффективным методом, уменьшающим выраженность ишемически-реперфузионного повреждения, частоту и выраженность ранней дисфункции трансплантатов печени.

Разработан метод ретроградной кавальной реперфузии трансплантата печени, способствующий снижению частоты всех форм ранней дисфункции трансплантата. Впервые показано, что ретроградная кавальная реперфузия печеночного трансплантата способствует более стабильным показателям системной гемодинамики непосредственно после осуществления реперфузии, чем техника портальной реперфузии.

Положения, выносимые на защиту

1. Экспрессия ядерного негистонового белка HMGB1 в ткани печени донора, экспрессия индуцируемого гипоксией фактора транскрипции HIF-1 α и количество CD68+-клеток в постреперфузионном биоптате трансплантата печени, а также уровень гепатоцитарного фактора роста в воротной вене через 2 ч после портальной реперфузии предшествуют клинической картине ранней дисфункции трансплантатов печени и являются ее иммуногистохимическими и серологическими предикторами.

2. Генотипы гена паттерн-распознающего толл-подобного рецептора-4 в локусе rs913930, содержащие минорную аллель C, ассоциированы с риском развития тяжелой формы ранней дисфункции трансплантатов печени. Механизм генетической детерминированности риска ранней дисфункции трансплантата печени включает экспрессию ядерного белка HMGB1, экспрессию CD68 в клетках печени доноров и внутripеченочную секрецию ИЛ-23 уже через 1 ч после портальной реперфузии трансплантата.

3. Фармакологическое прекондиционирование донора со смертью мозга ингаляционным анестетиком севофлуран и антиоксидантом ацетилцистеин способствует уменьшению выраженности ишемически-реперфузионного повреждения печени и снижению частоты ранней дисфункции всех трансплантатов с 50 до 16,7%, в группе реципиентов аллографтов печени с умеренно выраженным макровезикулярным стеатозом – с 60 до 18,8%.

4. Применение портально-артериальной перфузии печени раствором НТК и альбумина, содержащими такролимус, во время подготовки донорского органа к трансплантации уменьшает частоту тяжелого ишемически-реперфузионного повреждения с 26 до 4,1% (Fisher's exact; $p=0,04$), частоту всех форм ранней дисфункции трансплантата с 41,8 до 13,9% ($\chi^2=6,33$; $p=0,003$), ее умеренно тяжелой формы – с 23 до 2,3% (Fisher's exact; $p=0,009$).

5. Применение ретроградной кавальной реперфузии печени сопровождается сокращением времени ее тепловой ишемии с 45 [40; 55] до 40 [37; 45] мин (Mann – Whitney; $p=0,037$), способствует уменьшению частоты всех форм (относительное снижение частоты на 23%) и тяжелой формы ранней дисфункции трансплантата (относительное снижение частоты на 50%), сопровождается достоверно меньшими значениями АСТ в сыворотке крови в 1-е сутки после трансплантации ($p=0,01$). Ретроградная кавальная реперфузия печеночного трансплантата способствует более стабильным показателям системной гемодинамики непосредственно после реперфузии, чем техника портальной реперфузии органа.

Личный вклад соискателя ученой степени

Автором самостоятельно выполнен патентно-информационный поиск, анализ отечественной и зарубежной литературы с оценкой актуальности темы, проблемных вопросов и путей их решения (вклад 100%). Совместно с научным консультантом определены цель и задачи диссертационного исследования.

Автором лично проведен анализ медицинских карт и электронных историй болезни 435 взрослых реципиентов, которым с апреля 2008 по апрель 2017 г. проведена ортотопическая трансплантация печени. Для выполнения диссертационной работы в программе STATISTICA создана база данных с 245 характеристиками каждого пациента. Автором разработан протокол и дизайн, организовано исполнение исследований, проведена международная регистрация и аудит протоколов исследований PATAC и REDLIT в регистре www.clinicaltrials.gov, сбор первичных материалов, сформированы базы данных, проведены статистическая обработка и анализ полученных результатов исследований. Соискателем лично получены основные научные результаты диссертации, сформулированы положения, выносимые на защиту, выводы и практические рекомендации (вклад 100%). Все разделы диссертационного исследования выполнены автором самостоятельно в УЗ «9-я городская клиническая больница» г. Минска (отдел трансплантологии, научный отдел) (личный вклад 80%).

Автор принимал непосредственное участие в операциях по мультиорганному забору и трансплантации печени, разработке и применению метода прекондиционирования донора со смертью мозга ингаляционным анестетиком севофлуран и антиоксидантом ацетилцистеин, метода ретроградной кавальной реперфузии трансплантата печени, перфузии трансплантата раствором НТК и раствором альбумина с такролимусом через воротную вену и печеночную артерию во время подготовки донорского органа к трансплантации (вклад 90%). Автор принимал непосредственное участие в обследовании и лечении пациентов. Осмотр и сбор анамнеза всех пациентов, включенных в клинические исследования, проведены соискателем лично. Результаты клинических исследований изложены в монографии, статьях и материалах конференций (личный вклад 60–100%) [1 – 57].

Морфологические и иммуногистохимические исследования ИРП трансплантата, экспрессии негистонового ядерного белка HMGB1, экспрессии индуцируемого гипоксией фактора транскрипции HIF-1 α и количества CD68⁺-тканевых макрофагов в биоптатах печени проведены на базе УЗ «Городское клиническое патологоанатомическое бюро» г. Минска; вклад в публикации по данной тематике – 85% [1, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 21, 23, 34, 36, 37, 39, 40, 47, 49, 51, 52, 53, 55, 57, 60, 64].

Исследования по определению уровня липополисахарид-связывающего белка (ЛПСБ), уровня ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-17, ИЛ-23, ФНО- α , макрофагального воспалительного белка-1 α (МВБ-1 α) и P-selectin в крови из печеночных и периферических вен, гепатоцитарного фактора роста выполнены на базе лаборатории клеточных биотехнологий и научного отдела УЗ «9-я городская клиническая больница» г. Минска; вклад соискателя в публикации по данной тематике – 80% [1, 14, 16, 18, 19, 21, 23, 36, 39, 40, 41, 43, 44, 46–49, 51, 52, 54–56, 60, 64].

Исследование однонуклеотидных полиморфизмов rs11536865, rs5030717 и rs913930 гена TLR-4 выполнены на базе лаборатории научного отдела ГУ «РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии» и научного отдела УЗ «9-я городская клиническая больница» г. Минска; вклад в публикации по данной тематике – 80% [1, 18, 23–25, 27, 44, 48, 49, 50–53, 55, 57, 60, 64].

По теме диссертации разработаны и утверждены в Министерстве здравоохранения Республики Беларусь 3 инструкции по применению (личный вклад 70%). Автор принимал непосредственное участие в оформлении заявок на изобретения (вклад 60–100%) и актов внедрения (вклад 100%).

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов

Материалы исследований, включенные в диссертацию, доложены в виде устных и постерных докладов на II конференции Межрегиональной общественной организации «Общество трансплантологов» (Москва, 2010); XIV съезде хирургов Республики Беларусь (Витебск, 2010); Joint International Congress of International liver transplantation society, European liver-intestine transplant association, and The Liver Intensive Care Group of Europe (Валенсия, 2011); The 18th annual International liver transplantation society International Congress (Сан-Франциско, 2012); на VI Всероссийском съезде трансплантологов (Москва, 2012); The 19th annual International Liver transplantation society International Congress (Сидней, 2013); 16th European Society for Organ Transplantation Congress (Вена, 2013); 15-й Всероссийской конференции с международным участием «Жизнеобеспечение при критических состояниях» (Москва, 2013); The 20th Annual International Congress of the International liver transplantation society, European liver-intestine transplant association, and The Liver Intensive Care Group of Europe (Лондон, 2014); на VII Всероссийском съезде трансплантологов (Москва, 2014); International Congress of International association of surgeons, gastroenterologists and oncologists and the third CME Postgraduate Course «Avantguardia in the HPB-surgery and Liver transplantation: When East meets West» (Москва, 2014); на Республиканской научно-практической конференции молодых ученых

с международным участием «Минский консилиум–2014» (Минск, 2014); The 24th World Congress of the International Congress of International association of surgeons, gastroenterologists and oncologists (Вена, 2014); The 21st Annual International Congress of International liver transplantation society (Чикаго, 2015); на XXII Международном Конгрессе Ассоциации гепатопанкреатобилиарных хирургов стран СНГ «Актуальные проблемы гепатопанкреатобилиарной хирургии» (Ташкент, 2015); The 17th Congress of the European Society for Organ Transplantation (Брюссель, 2015); на VIII Всероссийском съезде трансплантологов (Москва, 2016); The 26th International Congress of Transplantation Society (Гонконг, 2016); на IV Международной научной конференции «Перспективы развития биологии, медицины и фармации» (Шымкент, 2016).

Получено 7 актов о внедрении результатов диссертации, из них 3 акта – в лечебный процесс УЗ «9-я городская клиническая больница» г. Минска, 1 – в УЗ «Брестская областная больница», 1 – в ГБУЗ НСО «Государственная Новоси-бирская областная клиническая больница», 1 – в Национальный научный центр онкологии и трансплантологии корпоративного фонда University Medical Center Республики Казахстан, 2 акта внедрения в учебный процесс ГУО «БелМАПО» и 1 – в ГУО «Витебский государственный медицинский университет».

Опубликование результатов диссертации

По теме диссертационного исследования опубликовано 66 печатных работ, включая 1 монографию (32,28 авт. листа), 26 статей (16,5 авт. листа), соответствующих п. 18 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь, из них 9 в зарубежных журналах. Статей в рецензируемых сборниках, не включенных в перечень ВАК Республики Беларусь, материалов конференций, конгрессов, съездов, симпозиумов, тезисов докладов – 30. Инструкций по применению, утвержденных Министерством здравоохранения Республики Беларусь – 3. Получено 4 патента Республики Беларусь на изобретения. Издано 2 учебно-методических пособия.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 207 страницах и состоит из введения, общей характеристики работы, главы аналитического обзора литературы, главы, посвященной используемым материалам и методам, 5 глав собственных результатов исследования, заключения, библиографического списка, включающего 302 наименований работ, 16 приложений. Диссертационная работа содержит 56 рисунков и 24 таблицы.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Материал и методы исследования

Для решения поставленных задач были проанализированы результаты лечения 435 взрослых реципиентов, которым в период с апреля 2008 по сентябрь 2017 г. выполнена ортотопическая трансплантация печени в Республиканском научно-практическом центре трансплантации органов и тканей на базе УЗ «9-я городская клиническая больница» г. Минска.

Медиана возраста реципиентов составила 50 [40; 56] лет, медиана возраста донора – 42 [30; 50] лет, медиана времени общей ишемии трансплантата – 480 [405; 540] мин, медиана времени тепловой ишемии трансплантата – 50 [45; 60] мин, медиана балла MELD – 17 [13; 23], медиана значения макровезикулярного стеатоза трансплантата – 10 [5; 20]%, медиана объема интраоперационной кровопотери – 1200 [700; 1800] мл.

В структуре показаний к трансплантации цирроз печени вирусной этиологии составил 25%, аутоиммунные и холестатические заболевания печени – 17%, гепатоцеллюлярный рак – 15%, алкогольный цирроз – 8%, врожденные метаболические заболевания печени – 8%, криптогенный цирроз – 6%, острая фульминантная печеночная недостаточность – 4%, синдром Киари – 2%, нерезектабельный альвеококкоз – 1% и другие (ретрансплантация, эпителиоид-гемангиоэндотелиома, метастазы карциноида).

Частота развития все форм РДТ составила 26,8% (117 пациентов). Госпитальная летальность (определена как все случаи смерти до 6 месяцев после ТП) от всех причин составила 10,3% (45 пациентов).

Результат однофакторного регрессионного анализа показал, что возникновение РДТ способствовало повышению риска летального исхода пациентов в 3,2 раза (ОШ 3,2 : 1; $p=0,0005$; 95% ДИ 1,6–6,2) по сравнению с реципиентами с неосложненным послеоперационным течением.

С целью определения прогностической значимости серологических маркеров для прогнозирования и диагностики РДТ печени проведено проспективное обсервационное исследование «случай-контроль» у 54 пациентов отобранных методом сплошной выборки, разделенных на группы по признаку развития/отсутствия послеоперационной дисфункции трансплантата.

Для определения прогностической роли ИГХ-маркеров в прогнозировании и диагностике РДТ печени проведено проспективное обсервационное исследование «случай-контроль» у 76 пациентов отобранных методом сплошной выборки после ТП, разделенных на группы по признаку развития/отсутствия РДТ послеоперационной дисфункции трансплантата.

Протокол исследования представлен в таблице.

Таблица. – Протокол исследования роли маркеров для прогнозирования и диагностики ранней дисфункции трансплантатов печени

Биопсия печени и проба крови во время мульти- органного забора (донорский биоптат)	Образцы крови во время трансплантации печени				Биопсия печени через 2 ч после портальной реперфузии	Образцы крови через 24 и 72 ч после ре- перфузии
	из воротной вены	из НПВ	Из печеночных вен			
			0 мин после реперфузии	1 ч после реперфузии		
ИГХ-окраска на CD68, HMGB1, HIF-1α Определение генотипа TLR-4	ЛПСБ, ИЛ-6		P-selectin, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-17, ИЛ-23, ФНО-α, МВБ-1α		ИГХ-окраска на CD68, HMGB1, HIF-1α	ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-17, ИЛ- 23, ФНО-α, МВБ-1α

Примечание – НПВ – нижняя полая вена.

В качестве серологических маркеров изучены концентрации ЛПСБ в портальной и кавальной крови перед снятием зажимов и реперфузией, концентрации ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-17, ИЛ-23, ФНО- α , МВБ-1 α и P-selectin в крови из печеночных вен через 1 ч после операции, а также из периферической вены реципиента через 24 и 72 ч после портальной реперфузии. Во время мультиорганного забора и через 2 ч после портальной реперфузии выполняли биопсию печени с целью ИГХ-окраски на маркеры активации тканевых макрофагов (CD68), повреждения (HMGB1) и ишемии гепатоцитов (HIF-1 α). В качестве направления исследования маркеров, пригодных для прогнозирования РДТ, сформулирована гипотеза:

– РДТ печени является результатом противоположно действующих векторов повреждения печени (оцениваются по уровню P-selectin, провоспалительных цитокинов, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-17, ИЛ-23, ФНО- α ; по экспрессии HMGB1, CD68) в процессе ее ишемии, реперфузии и вектора адаптации печени к ишемии и ее способности к регенерации (оценивается по экспрессии HIF-1 α , уровню HGF);

– уровни P-selectin, провоспалительных цитокинов, ФНО- α и МВБ-1 α в крови из печеночных вен, ЛПСБ в портальной крови и экспрессия HMGB1, CD68 и HIF-1 α в печени могут предшествовать клинической картине ранней дисфункции трансплантата и быть использованы в разработке модели прогнозирования и диагностики ранней дисфункции трансплантатов печени.

Для выявления клинических ассоциаций с полиморфизмом гена TLR-4 проведено исследование «случай-контроль» по обнаружению ассоциации между ранней дисфункцией аллографта и различными генотипами гена TLR-4 в однонуклеотидных полиморфизмах rs11536865, rs913930 и rs5030717. В исследование включен 71 пациент, которым с ноября 2013 по апрель 2015 г.

выполнена ТП. Критериями включения были: трансплантация печени от донора со смертью мозга без признаков маргинальности (уровень АСТ и АЛТ менее 200 МЕ/л, жировой гепатоз менее 40%, уровень Na до 165 моль/л, возраст до 60 лет, допускалось применение вазопрессоров). Критерии исключения: трансплантация от родственного донора, редуцированный графт, возраст реципиента менее 18 лет.

Все образцы крови доноров исследованы с использованием метода секвенирования по Сэнгеру, в результате чего «визуально», показан каждый нуклеотид однонуклеотидных полиморфизмов. Для постановки секвенирующей ПЦР использовали Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («Lifetechnologies», США). Секвенирование проводили на приборе 3500 Genetic Analyzer («Lifetechnologies», США). Результаты анализировали с использованием программы Sequencing Analysis («Lifetechnologies», США).

Для амплификации трех локусов гена TLR-4, в которых расположены однонуклеотидные полиморфизмы rs11536865 (G/C), rs5030717(A/G) и rs913930 (T/C), подобраны олигонуклеотидные праймеры [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>; W.S. Oetting и соавт., 2012).

Для получения специфичных ПЦР-продуктов трех исследуемых локусов гена TLR-4 ПЦР проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1×ПЦР буфер, 0,2mM dNTPs, 0,2 µL Phusion Green Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase («Thermo scientific», Финляндия), по 0,25 µM прямого и обратного праймера («Праймтех», Беларусь) и 5 µL геномной ДНК. Для проведения ПЦР геномную ДНК выделяли из образцов крови доноров с использованием набора для выделения ДНК «Нуклеосорб» («Праймтех», Беларусь).

С целью обоснования и оценки безопасности метода фармакологического preconditionирования донора со смертью мозга было проведено экспериментальное проспективное контролируемое рандомизированное слепое исследование влияния применения севофлурана и ацетилцистеина на выраженность ИРП донорской печени. Исследование выполнено у доноров со смертью мозга после оценки и признания донорской печени непригодной к трансплантации по совокупности факторов маргинальности.

Для выбора протокола ишемии и реперфузии изучены опубликованные экспериментальные исследования, в которых длительность периода ишемии варьировала от 30 до 90 мин, длительность периода реперфузии – от 15 мин до нескольких часов (U. Apte и соавт., 2015). Поскольку настоящее исследование по сути представляло первый опыт моделирования ИРП печени у донора со смертью мозга, референсных показателей в доступной литературе не было найдено. В этой связи для максимально возможной реализации процессов, характерных для ИРП у донора со смертью мозга в реальных условиях, мы выбрали длительность каждого этапа ишемии и реперфузии, равную 40 мин.

Ишемия и реперфузия донорского органа обеспечивали путем пережатия гепатодуоденальной связки на 40 мин и последующей реперфузии (снятие зажима с гепатодуоденальной связки) в течение 40 мин. Введение ацетилцистеина осуществляли внутривенно: в периферическую вену в дозе 30 мг/кг не менее чем за 40 мин до начала хирургической операции по мультиорганному забору и в воротную вену 300 мг в портальную вену непосредственно перед ее пережатием. Севофлуран подавали в дыхательный контур в дозе 1,8–2,1 об. % (0,8–1,0 минимальной альвеолярной концентрации) в течение не менее 40 мин до пережатия воротной вены.

Исследование проведено у 21 донора со смертью мозга и бьющимся сердцем. В основную группу исследования вошли 11 доноров, в контрольную группу – 10.

Для оценки клинической эффективности разработанного метода фармакологического прекондиционирования донора со смертью мозга проведено проспективное рандомизированное исследование влияния севофлурана на риск возникновения ранней дисфункции трансплантата. В основную группу и группу контроля были включены по 30 пациентов, отобранных методом сплошной выборки. Критериями исключения были трансплантация печени от живого родственного донора, возраст реципиента менее 18 лет, ретрансплантация и использование редуцированного трансплантата. Сразу после оценки качества донорской печени и подтверждения возможности трансплантации донорам группы фармакологического прекондиционирования в кислородо-воздушную смесь ($\text{FiO}_2=0,4$) добавляли севофлуран в дозе 2,0 об. % (1,0 минимальной альвеолярной концентрации) в течение всей операции по мультиорганному забору. В группе контроля донорам ингаляционно подавали только кислородо-воздушную смесь ($\text{FiO}_2=0,4$) без дыхательных анестетиков.

С целью определения влияния внутрипортального и внутриартериального введения такролимуса на раннюю функцию трансплантата печени проведено проспективное рандомизированное сравнительное в двух параллельных группах двойное слепое исследование (зарегистрировано в международном регистре клинических исследований как PATAC, www.clinicaltrials.gov, NCT01887171).

Критериями включения для данного исследования были: возраст донора 15–65 лет, макровезикулярный стеатоз менее 40%, содержание сывороточного Na менее 165 ммоль/л, длительность ИВЛ менее 11 сут., время холодовой ишемии менее 13 ч, показатели АСТ и АЛТ – менее 200 МЕ/л, общего билирубина – менее 35 мкмоль/л; возраст реципиента – 18–69 лет. Критерии исключения: ТП от живого родственного донора, редуцированные и split трансплантации, полиорганная недостаточность у реципиента, трансплантация по поводу первичного нефункционирования трансплантата.

В исследование включено 86 пациентов, которым выполнена ортотопическая ТП в УЗ «9-я городская клиническая больница» г. Минска от донора со смертью мозга с июня 2013 по июль 2014 г.

Основную группу составили 43 пациента, которым во время операции back-table осуществляли внутриворотное и внутриартериальное введение консервирующего раствора НТК (Кустодиол, Dr. Franz Kohler Chemie GmbH, Германия) и альбумина с содержанием такролимуса 20 нг/мл.

Контрольную группу составили 43 пациента, которым во время операции back-table осуществляли внутриворотное и внутриартериальное введение консервирующего раствора и альбумина, не содержащих такролимус.

Во время операции back-table канюлировали воротную вену и общую печеночную артерию. Выполняли перфузию воротной вены под давлением 40–60 см водяного столба раствором НТК в объеме 500 мл с содержанием такролимуса 20 нг/мл, а затем перфузию печеночной артерии 500 мл такого же раствора под давлением 40–50 мм рт. ст. Необходимое давление в артерии создавали с помощью ручного компрессионного инфузора. Затем с высоты 40–60 см в воротную вену вводили 200 мл 5% раствора с содержанием такролимуса 20 нг/мл.

После завершения перфузии у 16 случайно выбранных пациентов основной группы забирали образец эффлюэнта для определения концентрации такролимуса.

С целью исследования влияния ретроградной кавальной венозной реперфузии трансплантата печени на частоту и выраженность ранней дисфункции трансплантата печени и постреперфузионного синдрома проведено проспективное рандомизированное одноцентровое двойное слепое исследование (зарегистрировано в международном регистре клинических исследований как REDLIT, www.ClinicalTrials.gov, NCT02423941).

В исследование включены пациенты в возрасте 18–69 лет, которым выполнена ТП по классической методике с последовательной венозно-артериальной реперфузией. Критерии исключения: трансплантация печени от живого родственного донора, редуцированные и split-трансплантации, полиорганная недостаточность у реципиента перед ТП, первичное нефункционирование трансплантата как показание к ретрансплантации.

На основании расчета мощности в исследование ретроградной кавальной венозной реперфузии включено 112 пациентов (по 56 в каждой группе).

Для выполнения ретроградной кавальной реперфузии оба кавальных анастомоза формировали непрерывно без оставления дренирующей трубки в просвете НПВ. Далее до снятия кавальных зажимов формировали заднюю стенку портального анастомоза. Снятие кавальных зажимов приводило к ретроградному поступлению крови из НПВ в печень и воротную вену (около

200 мл). После этого донорскую воротную вену пережимали сосудистым зажимом и завершали переднюю стенку портального анастомоза. Перед портальной реперфузией снимали зажим с донорского отрезка воротной вены и выпускали ретроградно еще 100 мл крови. В завершение, снимая зажим с воротной вены реципиента, осуществляли портальную реперфузию.

Для морфологического анализа биоптатов печени их фиксировали в забуференном нейтральном 10% формалине и заключали в парафин. Гистологические срезы толщиной 2 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, а также иммуногистохимически с моноклональными антителами к маркерам CD68, HMGB1 и HIF-1 α . Подсчет CD68- и HMGB1-иммунопозитивных клеток выполняли при увеличении $\times 400$ и рассчитывали среднюю величину в 10 полях зрения. Содержание CD68- и HMGB1-иммунопозитивных клеток фиксировали в виде числа клеток в мм² (кл./мм²).

Содержание HIF-1 α иммунопозитивных клеток выражали полуколичественным методом по шкале от 1 до 4 (++++): 10 положительных клеток – 1+; 25% положительных клеток – 2+; 50% – 3+; > 50% – 4+.

Клетки подсчитывали с использованием микроскопа Leica Qwin DM LB. Микрофотографии готовых препаратов получены с применением микрофотокамеры-приставки Leica application suite, ver.3.7.0.

Определение концентрации ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-17, ИЛ-23, ФНО- α , МВБ-1 α и P-selectin в образцах крови из печеночных вен (полученных сразу после и через 1 ч после портальной реперфузии трансплантата печени) выполняли на мультиплексном анализаторе Luminex 200 (Luminex, США) с использованием коммерческих тест-систем Milliplex («Millipore», США) по инструкции производителя.

Расчет экономической эффективности проводили, используя утвержденную Министерством здравоохранения Республики Беларусь инструкцию по применению «Методика расчетов эффективности медицинских технологий в здравоохранении» (рег. № 159-12-3 от 31.12.2003).

Статистическая обработка результатов исследований выполнена с помощью пакета прикладных программ для медико-биологических исследований STATISTICA (Version 10, StatSoft Inc.) и Microsoft Office: mac2011.

При планировании, проведении и анализе результатов исследований использованы принципы и стандарты проведения и анализа клинических исследований, описанные St. B. Hulley и соавт. (2013), A. Petrie и C. Sabin (2012).

Параметры распределения количественных переменных, которое было отличным от нормального, представлены медианой с 25% и 75% квартилями, статистические параметры нормально распределенных переменных описаны

средним значением (M) и стандартным отклонением (SD) или стандартной ошибкой (SE).

Для описания качественных переменных использовано представление в виде пропорций и процентов в группах, а также таблиц сопряженности.

Для анализа сравнения были применены непараметрические методы: для сравнения двух независимых групп по одной количественной переменной использовали U-тест Mann – Whitney, при сравнении 3 и более переменных – тест Kruskal – Wallis (непараметрический ANOVA).

Для проверки нулевой статистической гипотезы об отсутствии различий частот бинарных переменных в двух независимых группах выполняли Chi-Square или двусторонний тест точного критерия Фишера (Fisher's exact).

Оценка взаимосвязи двух количественных переменных выполнялась методом ранговой корреляции по Спирмену (ρ).

Многофакторный анализ зависимой бинарной переменной проведен с помощью логистической регрессии.

Для определения чувствительности и специфичности ИГХ- и серологических прогностических маркеров РДТ применен ROC-анализ.

Поиск литературных источников выполнен в электронных базах данных Medscape, Pubmed (NLM) и Cochrane.

Определение прогностической значимости серологических и иммуногистохимических маркеров дисфункции трансплантата печени

По результатам проведенного анализа выявлены отличия в группах пациентов с РДТ и без нее в отношении экспрессии индуцируемого гипоксией фактора HIF-1 α , экспрессии гепатоцитами ядерного негистонового белка HMGB1, степени жирового гепатоза и морфологических признаков ИРП.

Количество окрашенных на HIF-1 α гепатоцитов в постреперфузионном биоптате значительно и достоверно отличалась в группе пациентов с умеренно тяжелой РДТ от таковой в группе без РДТ или с РДТ легкой степени по критериям P.R. Salvalaggio и соавт. (2012) (ANOVA, $p=0,025$).

В группе пациентов с РДТ печени количество окрашенных на HIF-1 α гепатоцитов через 2 ч после реперфузии составило 1+ (95% ДИ 0–2,0) и было достоверно меньше, чем в группе пациентов без РДТ: 2,25+($p=0,025$; 95% ДИ 1,9–2,6) (рисунки 1 и 2). Полученные данные подтверждают адаптогенную роль фактора транскрипции HIF-1 α в толерантности донорской печени к ИРП и способности к регенерации.

Оценка экспрессии HMGB1 гепатоцитами в донорских биоптатах печени выявила достоверное отличие (Mann – Whitney, $p=0,0036$) в группах пациентов с ранней дисфункцией аллогraftа и без нее после трансплантации печени.

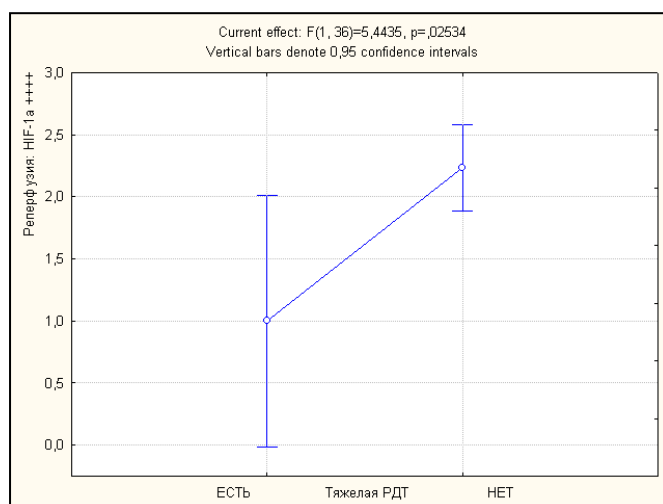


Рисунок 1. – Отличие экспрессии HIF-1α в биоптатах печени пациентов с РДТ и без

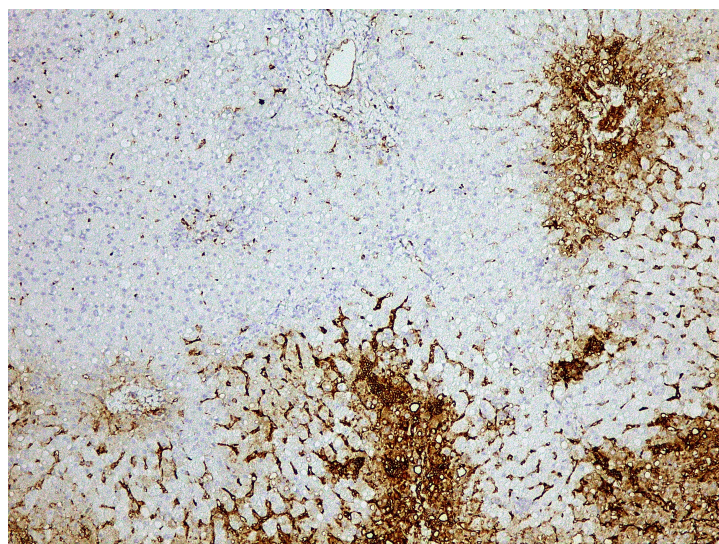


Рисунок 2. – Экспрессия HIF-1α при тяжелой форме РДТ; ИГХ-окрашивание с антителами к HIF-1α, хромоген-диаминобензидин, контрокрашивание гематоксилином Майера, ув. ×20

Содержание HMGB1+-гепатоцитов в донорских биоптатах у пациентов с РДТ составило 21 [20; 29]%, что достоверно больше, чем у пациентов без РДТ: 16 [14; 20]%. Изучение отношения лабораторных маркеров цитолиза к выявленным ИГХ-признаками РДТ выявило достоверную корреляционную связь между уровнем АСТ₂₄ и числом окрашенных CD68+-клеток в пост-реперфузионном биоптате ($\rho=0,33$, $p=0,0048$). Учитывая известный спектр клеток, экспрессирующих данный кластер дифференцировки в печени, можно утверждать, что CD68-иммунопозитивность в значительной степени отражает активацию тканевых макрофагов или клеток Купфера печени.

Подобная достоверная, но менее сильная связь получена между уровнем АСТ₂₄ и динамикой экспрессии CD68 в постреперфузионном и донорском биоптате ($p=0,29$, $p=0,023$). Результаты корреляционного анализа показали наличие достоверных связей между уровнем АЛТ₂₄ и количеством окрашенных CD68+-клеток в постреперфузионном биоптате ($p=0,33$, $p=0,0046$) и динамикой экспрессии CD68 в постреперфузионном и донорском биоптате ($p=0,36$; $p=0,041$). Такая же достоверная связь установлена между экспрессией HMGB1 гепатоцитами печени доноров и уровнем АСТ в сыворотке крови через 24 ч после реперфузии ($p=0,4$; $p=0,02$).

Результаты анализа изучаемых серологических маркеров повреждения печени выявили, что уровень МВБ-1 α в интраоперационной пробе крови из печеночной вены не был связан с риском развития РДТ. В отличие от МВБ-1 α концентрация HGF в интраоперационной пробе крови воротной вены (взятой через 2 ч после реперфузии) более 7934 нг/мл (чувствительность 62%; специфичность 74%, AUC=0,73; $p=0,01$) была достоверно ассоциирована с риском развития дисфункции трансплантата. Кроме того, изучение взаимосвязи между ИГХ- и серологическими маркерами выявило достоверную и сильную корреляцию между экспрессией CD68 на клетках печени доноров и концентрацией ИЛ-23 в крови из печеночных вен трансплантата через 1 ч после реперфузии ($p=0,62$; $p=0,04$).

Поскольку в основе РДТ лежит ИРП печени, был выполнен анализ взаимосвязи изучаемых ИГХ-предикторов развития РДТ печени с морфологическими критериями ИРП. Результаты анализа показали, что выраженное ИРП было ассоциировано с динамикой экспрессии гепатоцитами ядерного белка HMGB1 между измерениями, выполненными в биоптатах через 2 ч после реперфузии и в донорском биоптате (16 [1; 24]%) по сравнению со слабовыраженным ИРП: 1 [-4; 5]%. Кроме того, выраженное ИРП сопровождалось большей степенью инфильтрации графта CD68+-клетками через 2 ч после реперфузии, 65 [50; 93] кл./мм², по сравнению со слабовыраженным ИРП, 42 [31; 55] кл./мм².

При проведении ROC-анализа установлено, что увеличение степени цитоплазматического ИГХ-окрашивания гепатоцитов с антителами к HMGB1 в трансплантате (разница между уровнем экспрессии до и после реперфузии) более 13% (чувствительность 54%; специфичность 92%, AUC=0,73; $p=0,01$) было ассоциировано с тяжелой степенью ИРП и предшествовало клиническому развитию РДТ печени.

Степень экспрессии CD68 в ткани печени через 2 ч после реперфузии трансплантата более 48 кл./мм² (чувствительность 85%; специфичность 64%; AUC=0,77; $p=0,0002$) также ассоциирована с тяжелой степенью ИРП и предшествовала клиническому развитию РДТ (рисунок 3).

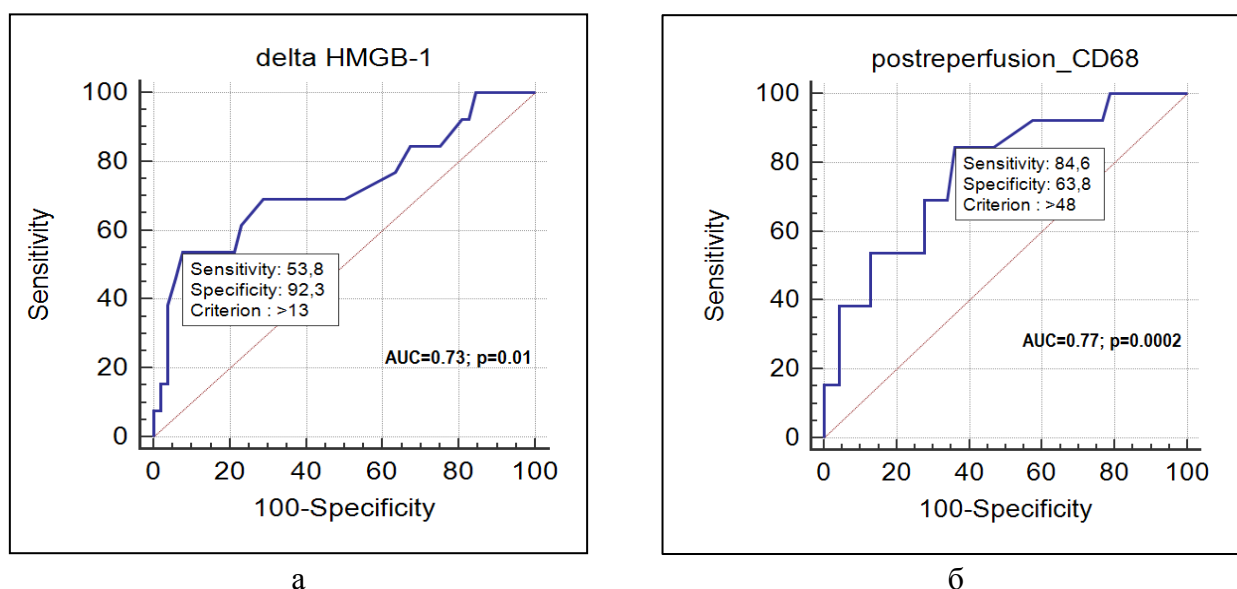


Рисунок 3. – Характеристическая кривая динамики экспрессии белков после реперфузии как предикторов развития ИРП печени тяжелой степени (ROC-анализ): а – HMGB1; б – CD68

Исследование прогностической значимости HGF методом ROC-анализа показало, что его концентрация в интраоперационной пробе крови из воротной вены (через 2 ч после реперфузии) более 7934 нг/мл (чувствительность 62%; специфичность 74%, AUC=0,73; p=0,01) ассоциирована с тяжелой степенью ИРП и развитием ранней послеоперационной дисфункции трансплантата печени.

Таким образом, проведенное исследование показало, что экспрессия гепатоцитами маркера и медиатора клеточного повреждения негистонового белка HMGB1, экспрессия СВ68 на тканевых макрофагах в биоптате печени на этапе донорского забора связана с уровнем ИЛ-23 в крови из печеночных вен трансплантата через 1 ч после реперфузии, а также с развитием РДТ у реципиента; экспрессия CD68 и HIF-1 α клетками печени в постреперфузионных биоптатах связана с уровнем АСТ, АЛТ и РДТ у реципиента, а концентрация HGF в интраоперационных пробах портальной крови через 2 ч после реперфузии ассоциирована с развитием ранней дисфункции трансплантата печени. Более того, уровень HGF в воротной вене через 2 ч после реперфузии и экспрессия HMGB1, CD68 и HIF-1 α клетками печени предшествуют клинической картине РДТ и поэтому являются предикторами развития РДТ печени.

Ассоциация генотипа толл-подобного рецептора-4 в локусе rs913930 с риском ранней дисфункции трансплантата печени

Проведенный анализ роли генотипа однонуклеотидного полиморфизма rs913930 гена ТЛР-4 в возникновении РДТ показал, что частота развития тяжелой формы РДТ составила 23,8% и была достоверно выше у пациентов с

генотипом донорской печени С/Т в локусе rs913930 по сравнению с пациентами с гомозиготными генотипами аллогraftа СС+ТТ: 6% (Fisher's exact; $p=0,04$), при этом частота РДТ по критериям К.М. Olthoff и соавт. (2010) и септических осложнений достоверно не отличалась между группами пациентов с генотипами С/Т и СС+ТТ (Fisher's exact; $p=0,3$). Результат однофакторного регрессионного анализа выявил, что риск развития РДТ у реципиентов аллогraftов печени с генотипом С/Т в локусе rs913930 гена ТЛР-4 был почти в 5 раз больше (ОШ 4,8 : 1; $p=0,047$; 95% ДИ 1–23,4), чем у реципиентов аллогraftов печени с гомозиготными генотипами СС+ТТ.

При дальнейшем анализе роли генотипов однонуклеотидного полиморфизма rs913930 гена ТЛР-4 в возникновении дисфункции трансплантата выявлено, что частота развития тяжелой формы РДТ составила 20,6% и была достоверно и значительно выше у реципиентов трансплантатов с обоими генотипами донорской печени, содержащими минорную аллель С в локусе rs913930, по сравнению с реципиентами трансплантатов с гомозиготным генотипом ТТ – 4,7% (Fisher's exact, $p=0,04$), при этом частота РДТ по критериям К.М. Olthoff и соавт. (2010) и септических осложнений достоверно не отличалась между реципиентами донорских органов с генотипами СС+С/Т и ТТ (4,7%; Fisher's exact, $p=0,6$). Однофакторный регрессионный анализ выявил, что риск развития РДТ у реципиентов аллогraftов печени с генотипами донорской печени, содержащими минорную аллель С гена ТЛР-4 в локусе rs913930, был в 5 раз больше, чем у реципиентов аллогraftов печени с генотипом ТТ. Полученное отношение шансов имело пограничную достоверность в изучаемой выборке пациентов (ОШ 5,2 : 1; $p=0,05$; 95% ДИ 0,9–28).

Результаты анализа ассоциаций полиморфизма клинически значимых однонуклеотидных замен гена ТЛР-4 в локусе rs913930 с изучаемыми иммуногистохимическими маркерами активации клеток Купфера и повреждения гепатоцитов (CD68 и HMGB1 соответственно) показали, что экспрессия HMGB1 в гепатоцитах печени донора с генотипом С/Т на этапе мультиорганного забора была достоверно выше, чем у доноров с генотипами СС и ТТ однонуклеотидного полиморфизма rs913930 гена ТЛР-4: 21 [17; 29]% и 16 [10; 19]% соответственно (Mann – Whitney; $p=0,01$; рисунок 4). Аналогично полученным данным по генотипу С/Т исследование показало, что у доноров с обоими генотипами донорской печени, содержащими минорную аллель С однонуклеотидного полиморфизма rs913930 гена ТЛР-4, выявлена достоверно большая экспрессия HMGB1 в печени на этапе мультиорганного забора, 19,5 [14; 29]% по сравнению с донорами с генотипом ТТ: 16 [10; 19]% (Mann – Whitney; $p=0,02$).

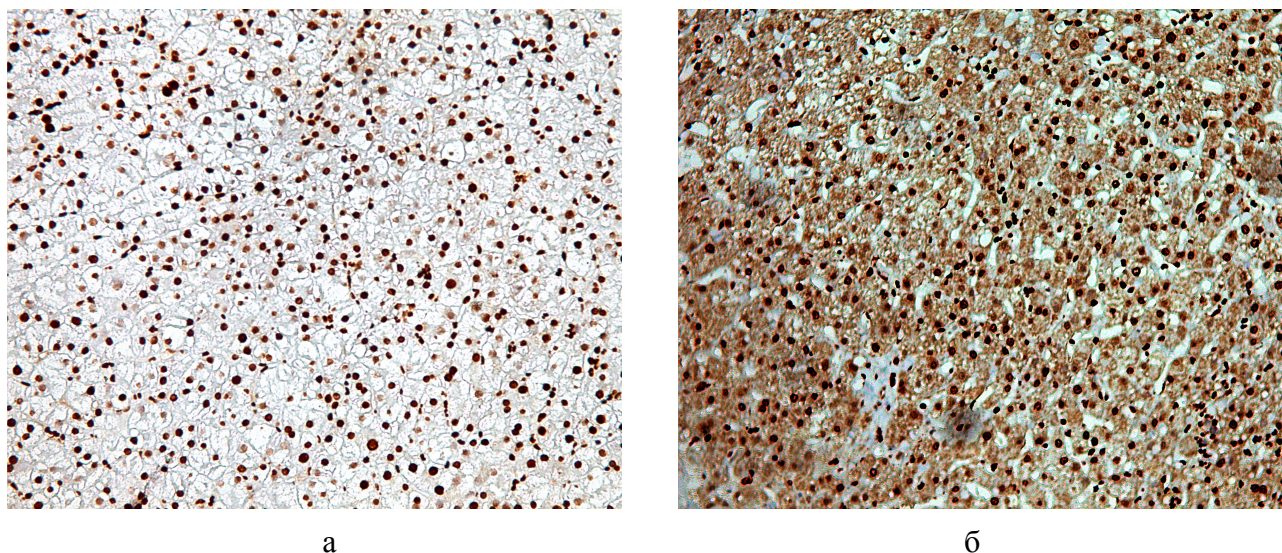


Рисунок 4. – Экспрессия HMGB1 гепатоцитами печени донора в зависимости от генотипа однонуклеотидного полиморфизма rs913930 гена TLR-4: а – генотип ТТ, б – генотип С/Т (ИГХ-окрашивание с антителами к HMGB1, хромоген-диаминобензидин, контрокрашивание гематоксилином Майера, ув. ×20)

Важно отметить, что в этом же разделе исследования была прослежена тенденция к большей экспрессии HMGB1 в гепатоцитах не только на этапе мультиорганного забора, но и через 2 ч после реперфузии (Mann – Whitney; $p=0,06$). Полученные данные позволяют утверждать, что ключевые звенья DAMP (экспрессия HMGB1) вовлечены в патологический механизм изменений гепатоцитов еще до ИРП трансплантата, обусловлены СВО на смерть мозга донора и имеют генетическую основу (ген рецептора TLR-4). Результаты дальнейшего анализа показали, что интенсивность ИГХ-окраски на HMGB1 у доноров гетерозигот (С/Т) в однонуклеотидном полиморфизме rs913930 коррелировала с количеством CD68-иммунопозитивных клеток ($p=0,47$; $p=0,04$) в биоптатах печени и концентрацией ИЛ-23 в крови из печеночных вен через 1 ч после реперфузии ($p=0,62$; $p=0,03$) у реципиентов трансплантатов печени.

Таким образом, оба генотипа гена TLR-4 в однонуклеотидном полиморфизме rs913930, содержащие минорную аллель С, были ассоциированы с риском развития тяжелой формы РДТ печени. Можно утверждать, что реализация TLR-4-опосредованной генетической детерминированности риска дисфункции трансплантата включает экспрессию гепатоцитами ядерного белка HMGB1, экспрессию CD68 на тканевых макрофагах печени доноров и внутрипеченочную секрецию ИЛ-23 уже через 1 ч после портальной реперфузии у реципиента, а активация HMGB1, экспрессия CD68 в печеночном аллографте и секреция ИЛ-23 предшествуют клинической картине тяжелой РДТ.

Влияние севофлурана и ацетилцистеина, используемых при прекондиционировании донора, на возникновение ранней дисфункции трансплантата печени

Протокол выполнения исследования представлен на рисунке 5.

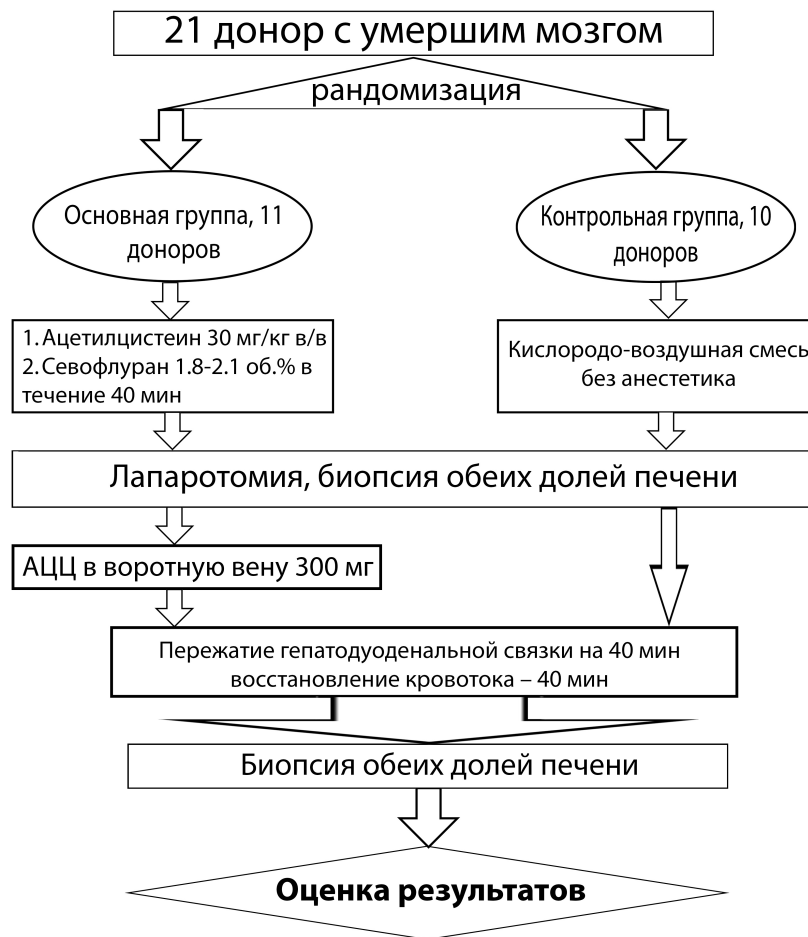


Рисунок 5. – Алгоритм рандомизированного исследования влияния севофлурана и ацетилцистеина на выраженность ИРП донорской печени

Применение фармакологического прекондиционирования доноров со смертью мозга ингаляционным анестетиком севофлуран и антиоксидантом ацетилцистеин в разработанной модели ишемии и реперфузии печени выявило, что среднее значение некроза гепатоцитов в группе контроля увеличилось с исходных $3,5 \pm 1,9\%$ до $7,3 \pm 2,0\%$, а в группе прекондиционирования уменьшилось с $6,5 \pm 2,6$ до $4,1 \pm 1,5\%$. Различие полученных показателей средних значений некроза после ишемии и реперфузии не достигло достоверного значения (t-критерий Стьюдента; $p=0,16$). Подобная тенденция наблюдалась и в отношении апоптоза гепатоцитов. Применение фармакологического прекондиционирования ингаляционным анестетиком севофлуран и антиоксидантом ацетилцистеин способствовало увеличению среднего значения

апоптоза гепатоцитов в группе контроля от $0,35 \pm 0,14\%$ до $0,78 \pm 0,2\%$, а в группе preconditionирования от $0,42 \pm 0,13\%$ до $0,5 \pm 0,15\%$, при этом различие полученных показателей средних значений апоптоза после ишемии и реперфузии достоверно не отличалось (t-критерий Стьюдента; $p=0,12$).

Достоверное отличие получено при изучении разницы среднего значения степени некроза гепатоцитов до и после моделирования ишемии и реперфузии, которая составила $+3,8\%$ в группе контроля и была достоверно больше, чем в группе preconditionирования $-2,4\%$ (Mann – Whitney, $p=0,001$), что указывает на торможение некробиотических процессов в ишемизированной печени, preconditionированной севофлураном и ацетилцистеином. Также получена достоверная разница среднего значения степени апоптоза гепатоцитов до и после моделирования ишемии и реперфузии, которая составила $+0,43\%$ в группе контроля и была достоверно больше, чем в основной группе: $+0,08$ (t-критерий Стьюдента; $p=0,01$).

Применение preconditionирования в подгруппе доноров со степенью жирового гепатоза 30% и более выявило, что разница степени некроза гепатоцитов до и после моделирования ишемии и реперфузии в группе контроля $+3,4\%$ была еще более значимой, чем в основной группе: $4,2\%$ (t-критерий Стьюдента; $p=0,008$). Такая же тенденция наблюдалась и при изучении разницы степени апоптоза гепатоцитов в подгруппе доноров с уровнем жирового гепатоза 30% и более, которая составила $+0,44\%$ в группе контроля и была достоверно больше, чем в группе preconditionирования: $+0,07$ (t-критерий Стьюдента; $p=0,02$).

Полученные результаты показали адекватность выбранной модели ИРП донорской печени и эффективность выбранного метода preconditionирования и позволили провести клиническое исследование влияния эффективности preconditionирования донора ингаляционным анестетиком севофлуран на частоту ранней дисфункции трансплантата печени, которое показало, что такое preconditionирование не оказывает влияния на ИРП трансплантата печени без макровезикулярного стеатоза.

Максимальные значения АСТ и АЛТ в 24–48 ч после реперфузии не отличались между двумя группами. Прослежена тенденция к меньшему уровню печеночных аминотрансфераз у реципиентов с жировым гепатозом до 30%. В подгруппе пациентов с умеренно выраженным жировым гепатозом (31–60%) медиана концентрации АСТ составила 979 [658; 2267] МЕ/л и была достоверно ниже у реципиентов трансплантатов печени после preconditionирования севофлураном по сравнению с реципиентами графтов без preconditionирования: 4002 [2322; 8601] МЕ/л ($p<0,05$). Результаты дальнейшего анализа выявили, что preconditionирование донора ингаляционным анестетиком севофлуран способствовало снижению частоты РДТ с 50 до 16,7%

в общей группе (Fisher's exact; $p=0,013$) и с 60 до 18,8% в подгруппе реципиентов трансплантатов с макровезикулярным жировым гепатозом до 30%. Несмотря на доказанные протективные свойства в отношении функции печени, имеются литературные данные о том, что севофлуран может угнетать агрегацию тромбоцитов и усиливать риск кровотечения, что очень важно для операции у пациента с циррозом печени и гиперспленизмом [А. Ауман и соавт., 2007].

В этой связи результаты собственного исследования по выбору тактики интенсивной терапии нарушений гемостаза на интраоперационную потребность в трансфузии компонентов крови при трансплантации печени показали высокую эффективность интенсивной терапии нарушений гемостаза, основанной на данных ротационной тромбоэластометрии, по сравнению с интенсивной терапией нарушений гемостаза по результатам стандартных коагуляционных тестов.

Настоящее исследование свидетельствует о том, что прекондиционирование донора ингаляционным анестетиком севофлуран снижает частоту РДТ у реципиентов трансплантатов печени с макровезикулярным стеатозом и подтверждает подобную тенденцию в мировой литературе, при этом является первым в ряду клинических исследований у доноров со смертью мозга (B. Beck-Schimmer и соавт., 2008; J.S. Ко и соавт., 2010).

Таким образом, фармакопротекция трансплантатов печени ингаляционным анестетиком севофлуран – новая стратегия улучшения послеоперационной функции трансплантата печени, которая легко воспроизводима и лишена риска серьезных нежелательных явлений.

Предреперфузионная портально-артериальная перфузия трансплантата печени раствором НТК, содержащим такролимус

Результаты сравнения исследуемых групп с портально-артериальной перфузией и без нее показали, что они были сопоставимы по баллу MELD, возрасту реципиента, длительности периода общей и тепловой ишемии трансплантата, уровню стеатоза и баллонной дистрофии. Возраст донора был достоверно больше ($p=0,043$) в контрольной группе, чем в группе портально-артериальной перфузии: 44,5 [37; 51] лет и 39 [26; 47] лет. В этой связи выбранные критерии включения пациентов в данное клиническое исследование были репрезентативны в отношении типичного реципиента, нуждающегося в трансплантации печени, приближены к реальным условиям трансплантации печени и обеспечили статистически достоверную однородность групп исследования, что при получении различий в частоте и выраженности ранней дисфункции трансплантата печени может быть интерпретировано как следствие влияния изучаемой интервенции (back-table, портальной и

артериальной перфузии раствором НТК и раствором альбумина, содержащими такролимус).

В результате выполненного исследования установлено: РДТ по критериям К.М. Olthoff и соавт. (2010) развилась у 6 пациентов основной группы с добавлением такролимуса в консервирующий раствор на back-table (13,9%), что достоверно меньше, чем в группе контроля: 41,8% (18 из 43 пациентов), ($\chi^2=6,33$; $p=0,003$); частота умеренно тяжелой РДТ по критериям P.R. Salvalaggio и соавт. (2012) в основной группе 1/43 (2,3%) была также значительно меньше, чем в контрольной группе 10/43 (23,2%), (Fisher's exact; $p=0,009$).

Проведенный анализ максимальных значений АСТ и АЛТ в первые 24 и 48 ч после реперфузии показал, что медиана концентрации АСТ₂₄ в основной группе составила 1004 [641; 1515] МЕ/л и была достоверно и значительно ниже, чем в группе контроля, – 1596 [675; 2781] МЕ/л (Mann – Whitney; $p=0,03$).

Прослежена тенденция к меньшей медиане концентрации АЛТ₂₄ в основной группе – 449 [384; 939] МЕ/л по сравнению с контрольной – 759 [437; 1087] МЕ/л (Mann – Whitney; $p=0,057$). Менее значимые различия получены для медиан максимальных концентраций АСТ₄₈ и АЛТ₄₈.

Морфологическая оценка применения портально-артериальной перфузии трансплантата с такролимусом показала, что частота тяжелого ИРП (некроз в периферической и 2-й зоне более 30%, апоптоз 3–5%) составила 26% (6/23) в группе контроля и была достоверно выше, чем в основной группе: 4,1% (1/24), (Fisher's exact; $p=0,04$). Статистически менее значимое отличие между группами получено для умеренно тяжелого ИРП (некроз более 15%, апоптоз 1,5–5%).

Проведенный анализ концентрации провоспалительных цитокинов показал, что изменение концентрации ИЛ-17 между пробами крови из печеночных вен сразу после портальной реперфузии и через 1 ч был достоверно меньше в группе пациентов, получивших инфузию такролимуса в воротную вену и печеночную артерию во время back-table (Mann – Whitney; $p=0,045$).

В группе портально-артериальной перфузии отмечено статистически значимое снижение медианы концентрации ИЛ-6 в крови из периферической вены через 24 ч после операции до 2,2 [0,1; 20,9] нг/мл, по сравнению с контрольной группой – 37,6 [6,1; 56,2] нг/мл ($p=0,03$).

Также прослежена тенденция к снижению медианы концентрации ИЛ-2 в крови из периферической вены через 24 ч после операции до 0,83 [0,1; 14,9] нг/мл, в сравнении с уровнем ИЛ-2 в группе без такролимуса: 42,01 [18,9; 50,6] нг/мл ($p=0,07$).

Изучение корреляций концентраций провоспалительных цитокинов в крови из печеночных вен реципиентов трансплантатов показало наличие связи

между концентрацией ИЛ-17 в печеночных венах через 1 ч после портальной реперфузии и уровнем АСТ₄₈ ($p=0,4$; $p < 0,05$).

Установлено значительное снижение уровня ИЛ-23 в пробе крови из печеночных вен через 1 ч после реперфузии в группе портально-артериальной перфузии с такролимусом по сравнению с концентрацией ИЛ-23 в группе без портально-артериальной перфузии (Mann – Whitney; $p=0,05$) (рисунок 6).

Проведенный анализ безопасности разработанного метода выявил, что частота первичного нефункционирования трансплантата не отличалась в исследуемых группах (по 1 случаю) (Fisher's exact; $p=1$). Частота почечной недостаточности с потребностью в заместительной почечной терапии в раннем послеоперационном периоде также не отличалась в основной и контрольной группе: 20% и 13,9% ($\chi^2=0,7$; $p=0,5$).

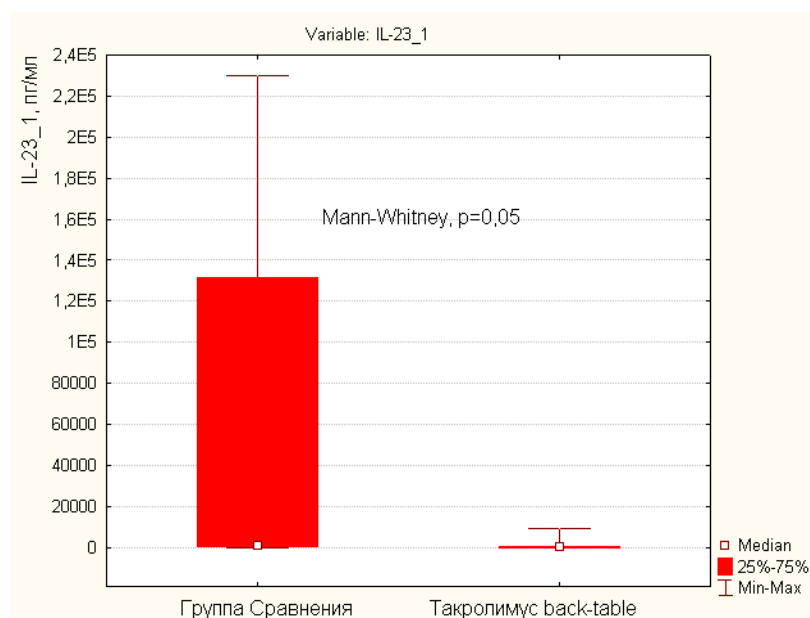


Рисунок 6. – Отличие концентрации ИЛ-23 в пробе крови из печеночных вен через 1 ч после реперфузии в группах с добавлением такролимуса и без

Частота септических осложнений достоверно не отличалась и составила 20% в основной и 16,2% в группе без портально-артериальной перфузии ($\chi^2=0,31$; $p=0,7$). Госпитальная летальность составила 4,6% в основной группе и была незначительно меньше, чем в группе контроля: 6,9% (Fisher's exact; $p=1$).

Таким образом, результатом исследования портально-артериальной перфузии печеночного трансплантата раствором НТК с такролимусом стало не только уменьшение частоты всех форм, но и умеренно тяжелых форм РДТ по критериям P.R. Salvalaggio и соавт. (2012) с 23,2% до 2,3%, что не было показано ранее. Морфологическим подтверждением эффективности данного метода стало уменьшение частоты тяжелого ИРП в постреперфузионных

биоптатах печени, чего не отмечалось ранее в исследованиях вариантов предреперфузионного флешинга. Важным результатом исследования является уменьшение уровней ИЛ-2 и ИЛ-6 через 24 ч после реперфузии в крови из периферических вен пациентов основной группы и уровней ИЛ-17 и ИЛ-23 в крови, оттекающей от печени через 1 ч после портальной реперфузии, что объясняет возможный механизм действия портально-артериальной перфузии с такролимусом.

Для оценки результатов внедрения данного метода проведено ретроспективное исследование, которое показало, что применение портально-артериальной перфузии печеночного трансплантата раствором НТК с такролимусом способствует достоверному уменьшению медианы длительности госпитализации с 18 [15; 22] до 15 [13; 20] сут. (Mann – Whitney; $p=0,01$) и снижению риска госпитальной летальности на 45% ($p=0,046$; 95% ДИ 0,2–0,9).

Полученная в многофакторном регрессионном анализе модель РДТ показала, что увеличение времени тепловой ишемии на 1 минуту повышало риск развития РДТ на 2,6% (ОШ 2,6 : 1; 95% ДИ 0,0012–0,37), а увеличение степени жирового гепатоза донорской печени на 1% повышало риск развития РДТ на 5,3% (ОШ 5,3 : 1; 95% ДИ 0,0016–0,059). Несмотря на статистическую корректность построенной модели (показатель F-статистика Фишера равен 9,7 при $p<0,00001$ и стандартной ошибке оценки 0,4), коэффициент детерминации R показал, что только 35% случаев РДТ объясняется влиянием выбранных предикторов в построенной модели ($R=0,351$). Введение же в модель фактора портально-артериальной перфузии трансплантата печени с такролимусом статистически нивелировало вклад тепловой ишемии в развитие РДТ ($p=0,7$; 95% ДИ 0,006–1,24).

Влияние ретроградной кавальной реперфузии трансплантата печени, на возникновение ранней послеоперационной дисфункции

Исследуемые группы были сопоставимы по баллу MELD, возрасту реципиента, длительности периода общей ишемии трансплантата, уровню стеатоза и баллонной дистрофии. Медиана длительности периода тепловой ишемии трансплантата в группе ретроградной реперфузии составила 40 [37; 42] мин и была достоверно ниже, чем в группе контроля 45 [40; 55] мин, что отражает суть метода, ведущего к сокращению периода тепловой ишемии трансплантата печени.

Результат анализа данных показал, что применение ретроградной кавальной реперфузии способствовало относительному уменьшению частоты дисфункции трансплантата по критериям К.М. Olthoff и соавт. (2010) на 23%: с 23,2% в группе портальной реперфузии до 17,8% (10/56) в основной группе ($\chi^2=0,8$; $p=0,3$). Частота развития тяжелой формы РДТ по критериям

P.R. Salvalaggio и соавт. (2012) в основной группе (7,1%) была меньше, чем в группе контроля (14,2%). Различие этих показателей не достигло уровня статистической значимости (Fisher's exact; $p=0,1$), но с клинической точки зрения представляет собой относительное снижение частоты тяжелой формы РДТ на 50%. Результат анализа максимальных значений АСТ и АЛТ в первые 24 и 48 ч после реперфузии выявил, что уровень АСТ₂₄ в группе ретроградной кавальной реперфузии составил 791 [552; 1365] МЕ/л и был достоверно ниже, чем в группе контроля - 1072 [502; 1819] МЕ/л (Mann – Whitney; $p=0,013$).

Такая же тенденция прослеживалась и в сплошном ретроспективном исследовании с дизайном «случай-контроль» после завершения основного исследования. Для обеспечения наибольшей однородности исследуемой категории пациентов критериями исключения были дата операции до 2012 г., возраст на момент операции менее 12 лет, использование редуцированных трансплантатов и консервирующего раствора Университета Висконсин. В результате для анализа были доступны данные 206 пациентов, 68 из которых была применена ретроградная кавальная реперфузия, 138 – стандартная портальная реперфузия. Проведенный анализ максимальных значений АСТ и АЛТ в первые 24 и 48 ч после реперфузии в ретроспективном исследовании показал, что уровень АСТ₂₄ в группе ретроградной кавальной реперфузии составил 821 [571; 1388] МЕ/л и был также достоверно ниже, чем в группе портальной реперфузии – 1221 [674; 1935] МЕ/л (Mann – Whitney; $p=0,01$).

Изучение гемодинамических показателей выявило, что у пациентов, рандомизированных в группу ретроградной кавальной реперфузии и имевших исходно худшие гемодинамические показатели, медиана систолического давления в течение 20 мин после реперфузии была достоверно выше, чем в группе портальной реперфузии: 103,5 [90; 110] мм рт. ст и 92 [82; 105] мм рт. ст. соответственно (Mann – Whitney, $p=0,04$). Такая же тенденция прослеживалась при анализе частоты сердечных сокращений: пациенты, рандомизированные в группу ретроградной кавальной реперфузии, имели меньшую склонность к брадикардии – характерной черте постреперфузионного синдрома. Этот эффект выражался в достоверно большей частоте сердечных сокращения на 10-й минуте после ретроградной кавальной реперфузии, 85 [75; 95] уд./мин, чем в группе пациентов с портальной реперфузией: 70 [55; 80] уд./мин (Mann – Whitney; $p=0,04$). Такая же тенденция наблюдалась на 20-й минуте после реперфузии (Mann – Whitney; $p=0,05$).

Для оценки показателей безопасности разработанного метода проведен анализ, который выявил, что частота развития почечной недостаточности с потребностью в заместительной почечной терапии в раннем послеоперационном периоде не отличалась в группах и составила 14,2% (8/56) ($\chi^2=0,07$; $p=1$). Частота септических осложнений также достоверно не

отличалась в исследуемых группах и составила 21,4% в основной и 23,2% в группе контроля ($\chi^2=0,05$; $p=1$). Госпитальная летальность не отличалась и составила 5,3% (3/56) в обеих группах (Fisher's exact; $p=1$).

Несмотря на прерывистую кавальную реперфузию и кажущуюся тепловую ишемию трансплантата печени в интервале между снятием зажимов с НПВ и восстановлением антеградного кровотока по воротной вене, ретроградная кавальная репрефузия не ведет к риску ишемических билиарных осложнений. Данный метод реперфузии трансплантата печени по сути является прототипом ишемического посткондиционирования (William R. J. и соавт., 2012), эффективность которого связывают с накоплением в ткани печени индуцируемого гипоксией фактора транскрипции HIF-1 α (F. Serracino-Inglott и соавт., 2003), подтверждением чего являются результаты собственного исследования прогностической роли ИГХ-маркеров. Исследование частоты возникновения билиарных осложнений, а именно хиларной и диффузной форм ишемической билиопатии, не показало отличий в исследуемых группах: 1,7% (1/56) в основной и 5,3% в контрольной группе (Fisher's exact; $p=0,3$). Частота выявления анастомотических билиарных стриктур в исследуемых группах не отличалась и составила 3,5% в основной и 5,3% в группе контроля (Fisher's exact; $p=1$). Частота развития всех билиарных осложнений (анастомотических билиарных стриктур, ишемической билиопатии и несостоятельности анастомоза) в группах не отличалась и составила 7,1% в основной и 8,9% в контрольной группе (Fisher's exact; $p=1$). Тем не менее, всем донорам на этапе мультиорганного забора для уменьшения риска развития билиарных осложнений применяли внутривенное введение гепарина и стрептокиназы, что по данным собственного исследования способствует значительному уменьшению частоты возникновения неанастомотических билиарных стриктур с 13,6% до 2,2% (Fisher's exact; $p=0,03$), и уменьшению сроков их возникновения (критерий Колмогорова – Смирнова; $p<0,05$).

Таким образом, ретроградная кавальная реперфузия является безопасным методом и сопровождается снижением медианы длительности периода тепловой ишемии до 40 [37; 42] мин по сравнению с таковой в группе контроля – 45 [40; 55] мин ($p=0,037$; Mann – Whitney). Ретроградная кавальная реперфузия способствует уменьшению частоты развития всех форм РДТ (относительное снижение частоты на 23%) и тяжелой формы РДТ (относительное снижение частоты на 50%), сопровождается меньшими максимальными значениями АСТ в 1-е сутки после трансплантации. Ретроградная кавальная реперфузия печеночного трансплантата способствует более стабильным показателям системной гемодинамики непосредственно после реперфузии, чем техника портальной реперфузии, благодаря разделению по времени снятия зажимов с НПВ и воротной вены.

Для оценки результатов внедрения данного метода проведено ретроспективное исследование, которое показало, что применение ретроградной кавальной реперфузии трансплантата печени способствует уменьшению медианы длительности госпитализации пациентов с 17 [14; 23] сут. до 15 [13; 20,5] сут. (Mann – Whitney; $p=0,048$) и снижению риска госпитальной летальности на 58% ($p=0,01$; 95% ДИ 0,21–0,81).

Общий экономический эффект предотвращения 1 случая РДТ в результате применения метода прекондиционирования донора со смертью мозга ингаляционным анестетиком севофлуран, применения метода портально-артериальной перфузии трансплантата с такролимусом и метода ретроградной кавальной реперфузии складывается из сокращения сроков лечения в отделении реанимации и интенсивной терапии на 5 сут., сроков госпитализации – в среднем на 11 сут., расходов на лечение в отделении реанимации и интенсивной терапии не менее чем на 12 800 бел. руб., расходов на продленный вено-венозный диализ и другие экстракорпоральные методы детоксикации – на 4800 бел. руб., расходов на лечение в целом – на 19 600 бел. руб.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Исследование прогностической значимости иммуногистохимических и серологических маркеров продемонстрировало, что развитию клинической картины дисфункции трансплантата печени предшествовала значительно большая экспрессия маркера повреждения гепатоцитов HMGB1 в ткани печени на этапе мультиорганного забора, 21 [20; 29]% по сравнению с таковой в трансплантатах реципиентов с не осложненным течением: 16 [14; 20]% (Mann – Whitney; $p=0,0036$) и менее выраженная экспрессия регулятора транскрипции клеточного ответа на гипоксию HIF-1 α через 2 ч после реперфузии, 1+(95% ДИ 0–2,0), в отличие от его экспрессии у пациентов без дисфункции трансплантата: 2,25+ ($p=0,025$; 95% ДИ 1,9–2,6).

В результате корреляционного анализа выявлено, что уровень АСТ и АЛТ в сыворотке крови пациентов в 1-е послеоперационные сутки был связан с количеством CD68+-клеток в постреперфузионном биоптате ($p=0,33$, $p=0,0048$ и $p=0,0046$ соответственно), а уровень АСТ – с экспрессией HMGB1 в гепатоцитах биоптата печени доноров ($p=0,4$; $p=0,02$). Количество CD68+-клеток в биоптате печени доноров коррелировало с уровнем ИЛ-23 в крови из печеночных вен трансплантата через 1 ч после реперфузии ($p=0,62$; $p=0,04$).

С помощью ROC-анализа обнаружено, что концентрация HGF в интраоперационной пробе крови из воротной вены (через 2 ч после реперфузии) более 7934 нг/мл (чувствительность 62%; специфичность 74%,

AUC=0,73; $p=0,01$), увеличение экспрессии HMGB1 в трансплантате (после реперфузии, по сравнению с этапом донорского забора) более 13% (чувствительность 54%; специфичность 92%, AUC=0,73; $p=0,01$) и количество CD68+-клеток в постреперфузионном биоптате трансплантата более 48 кл./мм² (чувствительность 85%; специфичность 64%; AUC=0,77; $p=0,0002$) ассоциировано с тяжелой степенью ишемически-реперфузионного повреждения, предшествовали его клинической картине и были иммуногистохимическими и серологическими предикторами ранней дисфункции трансплантатов печени [1, 7, 15, 16, 19, 25–27].

2. Установлена патогенетическая роль полиморфизма паттерн-распознающего гена TLR-4 в локусе rs913930 в развитии ранней дисфункции трансплантата печени, доказано, что генотипы гена, содержащие минорную аллель С, ассоциированы с риском развития тяжелой формы дисфункции аллографта. Частота развития тяжелой формы ранней дисфункции трансплантата печени составила 23,8% и была существенно больше у реципиентов органов с генотипом донорской печени С/Т гена TLR-4 в локусе rs913930 по сравнению с реципиентами аллографтов с гомозиготными генотипами СС и ТТ: 6% (Fisher's exact; $p=0,04$).

Такая же тенденция наблюдалась при анализе частоты развития тяжелой формы ранней дисфункции трансплантата у реципиентов органов с минорной аллелью С гена TLR-4 (генотипы СС+С/Т) в локусе rs913930, которая составила 20,6% и была значительно больше, чем у реципиентов органов с гомозиготным генотипом ТТ: 4,7% (Fisher's exact; $p=0,04$). Однофакторный регрессионный анализ показал, что генотип С/Т однонуклеотидного полиморфизма rs913930 гена TLR-4 повышает риск развития тяжелой формы дисфункции трансплантата печени в 4,8 раза (ОШ 4,8 : 1; $p=0,047$; 95% ДИ 1–23,4).

Результаты иммуногистохимического анализа выявили, что донорские органы с генотипом С/Т однонуклеотидного полиморфизма rs913930 гена TLR-4 демонстрировали достоверно большее содержание HMGB1+-гепатоцитов, 21 [17; 29]%, чем аллографты с генотипами данного гена СС+ТТ: 16 [10; 19]% (Mann – Whitney; $p=0,01$). У доноров с генотипом печени СС+С/Т определена достоверно большая экспрессия HMGB1 в гепатоцитах на этапе мультиорганного забора, 19,5 [14; 29]%, по сравнению с донорами с генотипом ТТ: 16 [10; 19]% (Mann – Whitney; $p=0,02$). Кроме того, у доноров с генотипом донорской печени С/Т в локусе rs913930 выявлено достоверно большее количество CD68+-клеток в биоптате печени, полученном на этапе мультиорганного забора (Mann – Whitney; $p=0,03$).

Полученные данные подтверждают научную гипотезу о том, что ранняя дисфункция трансплантата обусловлена повреждением печени в результате синдрома СВО в ответ на смерть мозга и события, предшествующие ей у

донора со смертью мозга. Кроме фенотипических (возраст, уровень Na, жировой гепатоз, артериальная гипотензия у донора и др.), ранняя дисфункция трансплантата имеет генетические предпосылки, которые реализуются в результате специфических патологических процессов, характерных для трансплантации, таких как бактериальная транслокация и ишемически-реперфузионное повреждение [1, 15, 16, 18, 23–25, 27].

3. Разработанный метод фармакологического preconditionирования ингаляционным анестетиком севофлуран и антиоксидантом ацетилцистеин у маргинального донора способствует снижению степени некроза и апоптоза гепатоцитов на 6,2% (Mann – Whitney; $p=0,001$) и 0,35% (Mann – Whitney; $p=0,01$) соответственно по сравнению с группой контроля и обладает защитным эффектом по отношению к ишемически-реперфузионному повреждению. Протективный эффект фармакологического preconditionирования более выражен у маргинальных доноров с уровнем жирового гепатоза более 30%, что проявляется в снижении степени некроза и апоптоза гепатоцитов на 7,6% (Mann – Whitney; $p=0,008$) и 0,37% (Mann – Whitney; $p=0,02$) соответственно по сравнению с группой контроля.

Клиническое исследование влияния эффективности preconditionирования донора со смертью мозга ингаляционным анестетиком севофлуран показало положительную роль метода в отношении возникновения ранней дисфункции трансплантата печени и способствовало уменьшению частоты этого осложнения с 50 до 16,7% в общей группе (Fisher's exact; $p=0,013$) и с 60 до 18,8% в группе реципиентов трансплантатов печени с макровезикулярным стеатозом (Fisher's exact; $p=0,02$) [1–4, 6–10, 12, 20, 22, 27].

4. Применение разработанного метода инфузии раствора НТК и альбумина с такролимусом в воротную вену и печеночную артерию во время подготовки донорской печени к имплантации является эффективным способом, уменьшающим выраженность ишемически-реперфузионного повреждения, частоту и выраженность ранней дисфункции немаргинальных трансплантатов печени. Применение этого метода уменьшает частоту тяжелого ишемически-реперфузионного повреждения с 26 до 4,1% (Fisher's exact; $p=0,04$), частоту всех форм ранней дисфункции трансплантата – с 41,8 до 13,9% ($\chi^2=6,33$; $p=0,003$), частоту умеренно тяжелой формы ранней дисфункции немаргинальных трансплантатов печени – с 23 до 2,3% (Fisher's exact; $p=0,009$) [1–5, 10–12, 14, 21, 27].

5. Исследование вариантов реперфузии трансплантата печени показало, что последовательная портально-артериальная и одновременная артериально-портальная техника реперфузии одинаково эффективны в отношении билиарных осложнений в условиях, характерных для программы трансплантации печени в Республике Беларусь.

Разработанный метод ретроградной кавальной реперфузии сопровождается снижением медианы длительности периода тепловой ишемии, чем в группе контроля: 40 [37; 42] мин и 45 [40; 55] мин соответственно (Mann – Whitney; $p=0,037$) и способствует существенному уменьшению частоты развития всех форм ранней дисфункции трансплантата (относительное снижение частоты на 23%) и тяжелой формы ранней дисфункции (относительное снижение частоты на 50%), а также сопровождается меньшей концентрацией АСТ в сыворотке крови реципиента в 1-е сутки после трансплантации.

Метод ретроградной кавальной реперфузии печеночного трансплантата способствует более стабильным показателям системной гемодинамики непосредственно после осуществления реперфузии, чем техника портальной реперфузии [1–3, 17, 27].

Экономический эффект предотвращения 1 случая ранней дисфункции трансплантата в результате применения метода прекондиционирования донора со смертью мозга ингаляционным анестетиком севофлуран, применения метода портально-артериальной перфузии трансплантата с такролимусом и метода ретроградной кавальной реперфузии составляет 19 600 бел. руб.

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. С целью пред- и послеоперационного прогнозирования риска ранней дисфункции трансплантата печени рекомендуется выполнять ИГХ-исследование биоптата печени донора для оценки экспрессии HMGB1, CD68, HIF-1 α ; определение генотипа гена TLR-4 в локусе rs913930 методом ПЦР в реальном времени и определение концентрации HGF в пробе крови из воротной вены через 2 ч после венозной реперфузии.

Выявление генотипа CC или C/T в локусе rs913930 гена TLR-4, увеличение экспрессии HMGB1 в гепатоцитах в постреперфузионном биоптате более чем на 13% по сравнению с биоптатом, полученным до начала мультиорганного забора, количества CD68⁺-клеток в постреперфузионном биоптате более 48 кл./мм² и/или концентрации HGF более 7934 нг/мл свидетельствует о высоком риске ранней дисфункции трансплантата [1, 60, 64].

Наличие генотипа CC и/или C/T в локусе rs913930 гена TLR-4 указывает на высокий риск ранней дисфункции трансплантата и требует принятия решения об отказе от донора при тяжелом состоянии реципиента и наличии факторов маргинальности донора. В случае стабильного состояния реципиента и при отсутствии факторов маргинальности донора генотипы CC и C/T, пороговый уровень HGF в интраоперационной пробе, пороговое значение динамики экспрессии ядерного HMGB1 и количества CD68⁺-клеток в биоптате трансплантата печени являются показанием к применению защитных технологий трансплантата печени. К защитным технологиям относятся:

портально-артериальная перфузия консервирующим раствором с содержанием такролимуса 20 нг/мл во время операции back-table; ретроградная портальная реперфузия; внутривенное назначение ацетилцистеина реципиенту в дозе 50–100 мг/кг каждые 6 ч в течение первых 48 ч после трансплантации [1, 60, 64].

2. С целью снижения риска ранней дисфункции трансплантата печени следует выполнять фармакологическое прекондиционирование донора со смертью мозга ингаляционным анестетиком севофлуран и антиоксидантом ацетилцистеин [1, 58, 61, 63]. Для этого севофлуран подают в дыхательный контур в дозе 1,8–2,1 об.% (0,8–1,0 минимальной альвеолярной концентрации) в течение не менее 40 мин до флашинга. Коррекция гипотензии у донора (среднее артериальное давление менее 60 мм рт. ст.) осуществляется путем устранения гиповолемии за счет введения коллоидных растворов и путем коррекции вазоплегии с помощью введения норэпинефрина в дозе до 0,15 мкг/кг/мин. Сразу после оценки качества донорской печени и подтверждения возможности трансплантации внутривенно вводят ацетилцистеин в дозе 50 мг/кг (не менее 3000 мг в общей дозе) не менее чем за 40 мин до начала операции по мультиорганному забору [58].

3. Во время трансплантации печени с целью фармакологической гепатопротекции аллогraftа реципиента рекомендуется применять ингаляционный анестетик севофлуран. Для этого на этапе завершения гепатэктомии не менее чем за 40 мин до планируемой портальной реперфузии реципиенту начинают подавать в дыхательный контур севофлуран в дозе 1,8–2,1 об.% (0,8–1,0 минимальной альвеолярной концентрации) [1, 58]. Для уменьшения объема кровопотери и снижения потребности в трансфузии компонентов крови при проведении трансплантации печени от донора с признаками маргинальности, при которой применяется ингаляционный анестетик севофлуран и антиоксидант ацетилцистеин, оценку баланса в системе гемостаза и коррекцию выявленных нарушений необходимо проводить с использованием ротационной тромбоэластометрии [20, 59].

4. С целью предупреждения развития и уменьшения выраженности ранней дисфункции трансплантата печени рекомендуется выполнять портально-артериальную перфузию консервирующим раствором с такролимусом во время операции back-table [1, 58, 62].

5. При выполнении трансплантации печени целесообразно выполнять ретроградную кавальную реперфузию аллогraftа [1, 58, 60]. При наличии признаков риска развития ранней дисфункции трансплантата печени с целью уменьшения вероятности возникновения билиарных осложнений рекомендуется за 15–20 мин до флашинга донора осуществить внутривенное введение гепарина в дозе 25 000 Ед и стрептокиназы в дозе 1 500 000 Ед [13].

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

Монография

1. Трансплантационные технологии в хирургии печени : монография / О. О. Руммо, А. Е. Щерба, А. М. Дзядзько, И. И. Пикиреня. – Минск : БелМАПО, 2017. – 443 с.

Статьи в научных журналах

2. Опыт трансплантации печени в Республике Беларусь / А. Е. Щерба, Ю. В. Слободин, Е. Л. Авдей, С. В. Коротков, Л. В. Кирковский, А. М. Федорук, А. М. Дзядзько, О. О. Руммо // Новости хирургии. – 2009. – Т. 17, № 1. – С. 13–19.
3. Ортотопическая трансплантация печени при злокачественных новообразованиях / А. Е. Щерба, О. О. Руммо, Ю. В. Слободин, А. М. Дзядзько, Л. С. Болонкин, Е. О. Сантоцкий, Е. Л. Авдей, А. М. Федорук, И. И. Пикиреня, И. Л. Кулинкович, Д. П. Харьков, П. В. Козич, С. В. Коротков, Л. В. Кирковский, Д. И. Юрлевич, Г. В. Жук, Е. В. Гордей, М. А. Васюкевич // Онкол. журн. – 2009. – Т. 3, № 4. – С. 24–31.
4. Организация службы трансплантации печени в Республике Беларусь / О. О. Руммо, А. М. Дзядзько, А. М. Федорук, А. Е. Щерба, А. Ф. Минов // Трансплантология. – 2010. – № 1. – С. 68–71.
5. Анатомия печеночной артерии: клиническое значение при трансплантации печени / О. О. Руммо, С. В. Коротков, А. Е. Щерба, Ю. В. Зайцев, Д. И. Юрлевич, А. М. Федорук, Ю. В. Слободин, И. И. Пикиреня, Е. Л. Авдей, Л. В. Кирковский, Д. П. Харьков // Анналы хирург. гепатологии. – 2011. – Т. 16, № 3. – С. 72–78.
6. The influence of pharmacological preconditioning with sevoflurane on incidence of early allograft dysfunction in liver transplant recipients [Electronic resource] / A. F. Minou, A. M. Dzyadzko, A. E. Shcherba, O. O. Rummo // Anesthesiol. Res. Pract. – 2012. – Vol. 2012. – Mode of access: <https://www.hindawi.com/journals/arp/2012/930487/>. – Date of access: 01.11.2017.
7. Ишемически-реперфузионное повреждение печени / А. Е. Щерба, С. В. Коротков, А. Ф. Минов, М. М. Савчук, А. М. Дзядзько, О. О. Руммо // Мед. журн. – 2013. – № 1. – С. 27–31.
8. Влияние севофлурана и ацетилцистеина на ишемически-реперфузионное повреждение печени донора со смертью мозга / А. Е. Щерба, С. В. Коротков, А. Ф. Минов, Ю. В. Слободин, М. М. Савчук, А. М. Дзядзько, О. О. Руммо // Вестн. трансплантологии и искусств. органов. – 2013. – Т. 15, № 1. – С. 39–44.

9. Влияние тактики интенсивной терапии нарушений гемостаза на интраоперационную потребность в трансфузии компонентов крови и течение послеоперационного периода при трансплантации печени / А. Ф. Минов, А. М. Дзядзько, А. Е. Щерба, О. О. Руммо // Новости хирургии. – 2013. – Т. 21, № 3. – С. 69–78.

10. Экспериментальная гипотермическая машинная перфузия трансплантатов печени раствором «Кустодиол» (НТК) / А. Е. Щерба, С. В. Коротков, О. А. Лебедь, М. М. Савчук, А. М. Дзядзько, А. Ф. Минов, Е. О. Сантоцкий, О. О. Руммо // Новости хирургии. – 2014. – Т. 22, № 1. – С. 75–82.

11. Сосудистые осложнения после ортотопической трансплантации печени / Д. Ю. Филоник, М. М. Савчук, А. Е. Щерба, О. О. Руммо // Мед. журн. – 2014. – № 2. – С. 34–39.

12. Методы коррекции ишемически-реперфузионного повреждения маргинальных трансплантатов печени / М. М. Савчук, О. О. Руммо, А. Е. Щерба, С. В. Коротков, О. А. Лебедь // Хирургия. Вост. Европа. – 2014. – № 3. – С. 30–44.

13. Возможность использования стрептокиназы для профилактики билиарных осложнений после трансплантации печени / Ш. З. Шарипов, А. Е. Щерба, И. И. Пикиреня, А. А. Глинник, А. М. Федорук, С. В. Коротков, О. О. Руммо // Новости хирургии. – 2015. – Т. 23, № 1. – С. 85–90.

14. Предреперфузионная портально-артериальная перфузия трансплантата печени раствором НТК, содержащим такролимус, уменьшает частоту возникновения ранней дисфункции трансплантата печени / А. Е. Щерба, С. В. Коротков, Д. Ю. Ефимов, А. Ф. Минов, О. А. Лебедь, А. А. Коритко, А. М. Дзядзько, О. О. Руммо // Вестн. трансплантологии и искусств. органов. – 2015. – Т. 17, № 3. – С. 24–31.

15. Ассоциация уровня растворимых цитокинов с развитием послеоперационных осложнений после трансплантации печени / Д. Ю. Ефимов, А. А. Коритко, Е. А. Янушевская, Ю. С. Березнева, Г. В. Жук, С. В. Коротков, А. М. Дзядзько, А. Е. Щерба, О. О. Руммо // Воен. медицина. – 2016. – № 1. – С. 75–80.

16. Механизмы и оценка аллореактивности при трансплантации печени / Д. Ю. Ефимов, А. В. Носик, Г. В. Жук, С. В. Коротков, А. М. Дзядзько, А. Е. Щерба, О. О. Руммо // Мед. журн. – 2016. – № 1. – С. 50–55.

17. Программа педиатрической трансплантации печени в Беларуси / Д. А. Федорук, А. Е. Щерба, С. В. Коротков, Д. В. Батюков, А. Ф. Минов, М. Л. Катин, А. М. Федорук, Д. П. Харьков, Л. В. Кирковский, Е. О. Сантоцкий, А. М. Дзядзько, О. О. Руммо // Наука и инновации. – 2016. – № 8. – С. 22–25.

18. Риск ранней дисфункции трансплантата печени ассоциирован с полиморфизмом гена TLR-4 / А. Е. Щерба, Д. Ю. Ефимов, А. М. Кустанович, А. И. Киреева, С. В. Коротков, А. Ф. Минов, О. А. Лебедь, А. А. Коритко, В. М. Шамрук, А. М. Дзядзько, О. О. Руммо // Наука и инновации. – 2016. – № 8. – С. 36–39.

19. Роль гепатоцитарного фактора роста в регенерации и патогенезе осложнений после трансплантации печени / А. А. Коритко, Д. Ю. Ефимов, С. В. Коротков, С. И. Кривенко, А. Е. Щерба, О. О. Руммо // Наука и инновации. – 2016. – № 8. – С. 40–42.

20. Минов, А. Ф. Алгоритм интенсивной терапии нарушений гемостаза при трансплантации печени / А. Ф. Минов, А. М. Дзядзько, А. Е. Щерба // Наука и инновации. – 2016. – № 8. – С. 43–47.

21. Portal and Arterial Flushing with HTK and Tacrolimus Can Attenuate the Incidence of Early Liver Allograft Dysfunction / A. Shcherba, S. Korotkov, D. Efimov, A. Minou, O. Lebedz, A. Karytka, D. Fedaruk, E. Santotsky, A. Dzyadzko, O. Rummo // J. Transl. Med. Res. – 2016. – Vol. 21, № 2. – P. 109–115.

22. Чистенко, Г. Н. Лист ожидания трансплантации печени: состояние, проблемы, перспективы / Г. Н. Чистенко, О. О. Руммо, А. Е. Щерба // Мед. журн. – 2016. – № 3. – С. 142–146.

23. The risk of early liver allograft dysfunction is associated with the TLR-4 gene genotype in the RS913930 sequence and is implemented via HMGB1 nuclear protein, Kupffer cells and IL-23 activation / A. E. Shcherba, A. M. Kustanovich, A. I. Kireyeva, D. Y. Efimov, S. V. Korotkov, A. F. Minov, O. A. Lebedz, A. A. Koritko, D. A. Fedoruk, E. O. Santotsky, A. M. Dzyadzko, O. O. Rummo // Вестн. Трансплантологии и искусств. органов. – 2016. – Т. 18, № 3. – С. 31–38.

24. Патогенетическая роль ТЛР-рецепторов в развитии осложнений после трансплантации солидных органов / С. А. Красуцкая, Д. Ю. Ефимов, М. А. Фролова, Ч. В. Жук, С. В. Коротков, А. М. Дзядзько, А. Е. Щерба, О. О. Руммо // Воен. медицина. – 2016. – № 3. – С. 133–137.

25. Парадокс: печеночная недостаточность «защищает» больного? (гипотеза) / А. М. Дзядзько, А. Е. Щерба, О. О. Руммо, М. Л. Катин, А. Ф. Минов, С. В. Коротков, О. А. Чугунова, Е. О. Сантоцкий, Д. Ю. Ефимов, М. Ю. Гурова // Трансплантология. – 2017. – Т. 9, № 1. – С. 52–70.

26. Маркеры воспаления и инфекционные осложнения в раннем послеоперационном периоде при проведении ортотопической трансплантации печени / О. А. Чугунова [и др.] // Трансплантология. – 2017. – Т. 9, № 4. – С. 299–305.

27. Трансплантационные технологии в лечении заболеваний печени у взрослых и детей / О. О. Руммо, Д. Ю. Ефимов, А. Е. Щерба, А. М. Дзядзько // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2018. – Т. 15, № 1. – С. 17–27.

Материалы съездов, конгрессов, конференций, тезисы докладов

28. Первый опыт трансплантации печени в Республике Беларусь / Д. И. Юрлевич, Д. П. Харьков, Ю. В. Зайцев, С. В. Коротков, Ю. В. Слободин, А. Е. Щерба, Е. Л. Авдей, А. М. Федорук, О. О. Руммо // Состояние и перспективы трансплантологии : материалы междунар. науч.-практ. конф., 9–10 окт. 2008 г. / Ком. здравоохранения Мингорисполкома [и др.] ; ред. В. С. Кушниренко [и др.]. – Минск, 2008. – С. 152–156.

29. Лист ожидания больных на трансплантацию печени в Республике Беларусь / Е. В. Гордей, А. М. Федорук, О. О. Руммо, Е. Л. Авдей, А. Е. Щерба, Ю. В. Слободин, С. В. Коротков, Л. В. Кирковский, М. А. Васюкевич // Актуальные вопросы гепатологии: Экспериментальная гепатология. Терапевтическая гепатология. Хирургическая гепатология : материалы VIII Междунар. симп. гепатологов Беларуси, Могилев, 1–2 окт. 2009 г. / Упр. здравоохранения Могилев. облисполкома, Гродн. гос. мед. ун-т. – Минск, 2009. – С. 35–36.

30. Ранняя послеоперационная дисфункция печеночного трансплантата / А. Е. Щерба, О. О. Руммо, Ю. В. Слободин, Е. Л. Авдей, А. М. Федорук, А. М. Дзядзько, Л. С. Болонкин, А. Ф. Минов, Е. О. Сантоцкий, Д. П. Харьков, П. В. Козич, С. В. Коротков, Л. В. Кирковский, Д. И. Юрлевич, Ю. В. Зайцев, А. Б. Пискун, Г. В. Жук, М. А. Васюкевич // Актуальные вопросы хирургии : материалы XIV съезда хирургов Респ. Беларусь, Витебск, 11–12 нояб. 2010 г. / Витеб. гос. мед. ун-т [и др.] ; под ред. А. Н. Косинца. – Витебск, 2010. – С. 304.

31. Incidence of early allograft dysfunction in liver transplant recipients of deceased brain donor grafts with and without sevoflurane preconditioning / A. F. Minou, A. E. Shcherba, A. M. Dzyadzko, O. O. Rummo, A. M. Fedoruk, Y. V. Slobodin, E. L. Avdey, E. O. Santotski S. V. Korotkov // Liver Transpl. – 2011. – Vol. 17, suppl. 1: The 2011 Joint International Congress of ILTS, ELITA, and LICAGE, Valencia, June 22–25, 2011. – P. S190.

32. Preconditioning with sevoflurane decreases the incidence of early allograft dysfunction in liver transplant recipients of steatotic grafts / A. F. Minou, A. E. Shcherba, A. M. Dzyadzko, O. O. Rummo, A. M. Fedoruk, Y. V. Slobodin, D. P. Kharkou, E. O. Santotski, S. V. Korotkov // Liver Transpl. – 2012. – Vol. 18, suppl. 1: The ILTS 18th Annual International Congress, San Francisco, May 16–19, 2012. – P. S83.

33. Does kind of reperfusion influence the incidence of biliary strictures / A. E. Shcherba, S. Z. Sharipov, Y. V. Slabodzin, E. L. Avdey, I. I. Pikirenya, O. O. Rummo // Liver Transpl. – 2013. – Vol. 19, № 6, suppl. 1: 19th Annual International Congress. – P. S247.

34. Experimental hypothermic machine perfusion of discarded donor livers with HTK solution / A. Shcherba, A. Minou, E. Santotski, S. Korotkov, O. Lebedz,

A. Dzyadzko, O. Rumo // *Transpl. Int.* – 2013. – Vol. 26, suppl. 2: Abstracts of the 16th ESOT Congress, Vienna, Austria, 8–11 Sept. 2013. – P. 332.

35. Щерба, А. Е. Органопротекция в трансплантации печени [Электронный ресурс] / А. Е. Щерба // *Жизнеобеспечение при критических состояниях : 15-я Всерос. конф. с междунар. участием, Москва, 18–19 нояб. 2013 г. : тез. докл. / НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского РАМН [и др.] ; науч. ред. И. А. Козлов. – М., 2013. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).*

36. Влияние Back-Table портального и артериального флашинга раствором НТК, содержащим такролимус, на возникновение ранней дисфункции трансплантата печени / А. Е. Щерба, А. Ф. Минов, Д. Ю. Ефимов, С. В. Коротков, О. А. Лебедь, А. М. Дзядзько, А. А. Коритко, Е. О. Сантоцкий, О. О. Руммо // *Вестн. трансплантологии и искусств. органов.* – 2014. – Т. 16, прил.: Материалы VII Всерос. съезда трансплантологов, [28–30 мая 2014 г.]. – С. 137.

37. Клиническое значение экспрессии CD68 и HMGB1 рецепторов донорской печени в возникновении ранней дисфункции трансплантата / А. Е. Щерба, О. А. Лебедь, А. Ф. Минов, Д. Ю. Ефимов, С. В. Коротков, А. М. Дзядзько, О. О. Руммо // *Вестн. трансплантологии и искусств. органов.* – 2014. – Т. 16, прил.: Материалы VII Всерос. съезда трансплантологов, [28–30 мая 2014 г.]. – С. 144–145.

38. Antithrombin III as predictor of early graft function / A. Minou, A. Shcherba, D. Efimov, A. Dzyadzko, O. Rummo // *Liver Transpl.* – 2014. – Vol. 20, suppl. 1: The ILTS 20th Annual International Congress of ILTS, ELITA & LICAGE, London, June 1–7, 2014. – P. S302–S303.

39. Influence of Back Table Portal and Arterial Flushing with HTK and Tacrolimus on the Incidence of Liver Graft Dysfunction / A. E. Shcherba, A. F. Minou, D. D. Efimov, S. V. Korotkov, O. A. Lebedz, A. M. Dzyadzko, A. Karytka, E. O. Santotski, O. O. Rummo // *Liver Transpl.* – 2014. – Vol. 20, suppl. 1: The ILTS 20th Annual International Congress of ILTS, ELITA & LICAGE, London, June 1–7, 2014. – P. S367–S368.

40. Influence of back table portal and arterial flushing with HTK and tacrolimus on the incidence of liver graft dysfunction / A. E. Shcherba, A. F. Minou, D. J. Efimov, S. V. Korotkov, O. A. Lebedz, A. M. Dzyadzko, A. Karitka, E. O. Santotski, O. O. Rummo // *Hepatogastroenterology.* – 2014. – Vol. 61, suppl. 1: Materials of International Conference International Congress and the third IASGO CME Postgraduate Course «Avantguardia in the HPB-surgery and Liver transplantation: When East meets West», Moscow, Russian Federation, 6–8 June 2014. – P. S13–S14.

41. Влияние внутрипортального и внутриартериального введения такролимуса на операции back table на функцию трансплантата печени /

Д. Ю. Ефимов, А. Е. Щерба, С. В. Коротков, Г. В. Жук, А. А. Коритко, О. О. Руммо // Минский консилиум–2014 : сб. материалов Респ. науч.-практ. конф. молодых ученых с междунар. участием, Минск, 10–11 июня 2014 г. / Белорус. мед. акад. последиплом. образования ; редкол. Ю. Е. Демидчик [и др.]. – Минск, 2014. – С. 71–73.

42. Hypercoagulable Status as Predisposing Factor for Hyperfibrinolysis During Liver Transplantation / A. F. Minou, A. E. Shcherba, A. M. Dzyadzko, S. V. Korotkov, O. O. Rummo // Transplantation. – 2015. – Vol. 99, № 7S: 21st Annual International Congress, Chicago, 8–11 July 2015 : abstr. – P. 198.

43. Back-Table Portal and Arterial Liver Perfusion with HTK Solution + Tacrolimus Can Attenuate the Incidence and Severity of Graft Dysfunction / A. E. Shcherba, S. V. Korotkov, A. F. Minou, D. Y. Efimov, E. O. Santotski, A. A. Karitka, A. M. Dzyadzko, O. O. Rummo // Transplantation. – 2015. – Vol. 99, № 7S: 21st Annual International Congress, Chicago, 8–11 July 2015 : abstr. – P. 236.

44. Association of rs 913930 Genotypes of TLR-4 Gene With Early Graft Dysfunction After Liver Transplantation / A. E. Shcherba, A. M. Kustanovich, A. I. Kireyeva, D. Y. Efimov, A. A. Korytka, A. M. Dzyadzko, O. O. Rummo // Transplantation. – 2015. – Vol. 99, № 7S: 21st Annual International Congress, Chicago, 8–11 July 2015. : abstr. – P. 236–237.

45. Трансплантация печени при синдроме портальной гипертензии / О. О. Руммо, А. Е. Щерба, С. В. Коротков, Е. Л. Авдей, Л. В. Кирковский, Д. Ю. Ефимов // Актуальные проблемы гепатопанкреатобилиарной хирургии : материалы XXII Междунар. Конгр. Ассоц. гепатопанкреатобилиарных хирургов стран СНГ Ташкент, 7–9 сент. 2015 г. / Ассоц. гепатопанкреатобилиарных хирургов стран СНГ [и др.] ; под ред. В. А. Вишневого. – Ташкент, 2015. – С. 58.

46. Back-table portal and arterial liver perfusion with custodiol and tacrolimus reduce the incidence and severity of graft dysfunction / A. Shcherba, S. Korotkov, A. Minou, D. Efimov, E. Santotski, A. Karitka, A. Dzyadzko, O. Rummo // Transpl. Int. – 2015. – Vol. 28, suppl. 4: Abstracts of the 17th Congress of the European Society for Organ Transplantation, 13–16 Sept. 2015, Brussels, Belgium. – P. 61.

47. Soluble cytokine profiles and complications after liver transplantation / D. Efimov, A. Shcherba, A. Karytka, S. Korotkov, A. Dzyadzko, O. Lebedz, O. Rummo // Transpl. Int. – 2015. – Vol. 28, suppl. 4: Abstracts of the 17th Congress of the European Society for Organ Transplantation, 13–16 Sept. 2015, Brussels, Belgium. – P. 90.

48. Association of rs913930 genotypes of TLR-4 gene with early graft dysfunction after liver transplantation / A. Shcherba, A. Kustanovich, A. Kireyeva, D. Efimov, A. Korytka, A. Dzyadzko, O. Rummo // Transpl. Int. – 2015. – Vol. 28,

suppl. 4: Abstracts of the 17th Congress of the European Society for Organ Transplantation, 13–16 Sept. 2015, Brussels, Belgium. – P. 138.

49. DAMP-ассоциированное ишемически-реперфузионное повреждение и осложнения после трансплантации печени: подтверждение концепции / Д. Ю. Ефимов, О. А. Лебедь, С. В. Коротков, А. И. Киреева, Г. В. Жук, А. М. Дзядзько, А. Е. Щерба, О. О. Руммо // Вестн. трансплантологии и искусств. органов. – 2016. – Т. 18, прил.: VIII Всероссийский съезд трансплантологов : материалы съезда : тез. докл., 27–29 июня 2016 г. / под ред. С. В. Готье. – С. 94.

50. Ассоциация между полиморфизмом рецепторов TLR-4 донора и риском острого отторжения после трансплантации печени / Д. Ю. Ефимов, А. И. Киреева, А. В. Носик, Г. В. Жук, С. В. Коротков, А. М. Дзядзько, А. Е. Щерба, О. О. Руммо // Вестн. трансплантологии и искусств. органов. – 2016. – Т. 18, прил.: VIII Всероссийский съезд трансплантологов : материалы съезда : тез. докл., 27–29 июня 2016 г. / под ред. С. В. Готье. – С. 112.

51. Оценка риска развития ранней дисфункции трансплантатов печени [Электронный ресурс] / А. Е. Щерба, С. В. Коротков, Д. Ю. Ефимов, О. А. Лебедь, А. А. Коритко, А. И. Киреева, О. О. Руммо // Трансплантология и регенеративная медицина: достижения и перспективы / РНПЦ трансфузиологии и мед. биотехнологий ; под ред. М. П. Потапнева, А. И. Свирновского. – Минск, 2016. – Вып. 1. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

52. DAMP-associated preservation injury and complications after liver transplantation: proof of concept / D. Efimov, A. E. Shcherba, O. A. Lebedz, A. I. Kireeva, S. Korotkov, A. M. Dzyadzko, O. O. Rummo // Transplantation. – 2016. – Vol. 100, № 7S: 26th International Congress of Transplantation Society, Hong Kong, 18–23 Aug. 2016 : abstr. – P. S112.

53. Association between donor toll-like receptors-4 polymorphism and acute rejection after liver transplantation in Belarus / D. Efimov, A. E. Shcherba, A. M. Dzyadzko, A. I. Kireeva, S. Krasutskaja, S. Korotkov, O. O. Rummo // Transplantation. – 2016. – Vol. 100, № 7S: 26th International Congress of Transplantation Society, Hong Kong, 18–23 Aug. 2016 : abstr. – P. S487.

54. Гепатоцитарный фактор роста и осложнения после трансплантации печени / А. А. Коритко, С. И. Кривенко, Д. Ю. Ефимов, С. В. Коротков, А. Е. Щерба, О. О. Руммо // Хабаршысы. – 2016. – № 4: Перспективы развития биологии, медицины и фармации : материалы IV Междунар. науч. конф., Шымкент, Респ. Казахстан, 9–10 дек. 2016 г. – С. 195–197.

55. Метод оценки риска ранней дисфункции трансплантата печени / А. Е. Щерба, С. В. Коротков, Д. Ю. Ефимов, О. А. Лебедь, А. А. Коритко, А. И. Киреева, О. О. Руммо // Хабаршысы. – 2016. – № 4: Перспективы развития биологии, медицины и фармации : материалы IV Междунар. науч. конф., Шымкент, Респ. Казахстан, 9–10 дек. 2016 г. – С. 220–221.

56. Роль определения уровня растворимых цитокинов в диагностике послеоперационных осложнений после трансплантации печени / Д. Ю. Ефимов, А. Е. Щерба, А. А. Коритко, Р. Ж. Умбетжанов, Д. Д. Тоиров, С. В. Коротков, О. О. Руммо // Хабаршысы. – 2016. – № 4: Перспективы развития биологии, медицины и фармации : материалы IV Междунар. науч. конф., Шымкент, Респ. Казахстан, 9–10 дек. 2016 г. – С. 703–704.

57. Ишемически-реперфузионное повреждение и осложнения после трансплантации печени: подтверждение концепции / Д. Ю. Ефимов, А. Е. Щерба, О. А. Лебедь, С. В. Коротков, А. И. Киреева, А. М. Дзядзько, О. О. Руммо // Хабаршысы. – 2016. – № 4: Перспективы развития биологии, медицины и фармации : материалы IV Междунар. науч. конф., Шымкент, Респ. Казахстан, 9–10 дек. 2016 г. – С. 705–707.

Инструкции

58. Метод предотвращения ишемически-реперфузионного повреждения и улучшения послеоперационной функции маргинального трансплантата печени : инструкция по применению : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 04.10.2013 / А. Е. Щерба, А. М. Дзядзько, А. Ф. Минов, С. В. Коротков, Е. О. Сантоцкий, О. О. Руммо. – Минск, 2013. – 7 с.

59. Метод диагностики и терапии нарушений гемостаза при трансплантации печени : инструкция по применению : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 05.12.2013 / А. Ф. Минов, А. М. Дзядзько, А. Е. Щерба, О. В. Калачик, О. О. Руммо. – Минск, 2013. – 5 с.

60. Метод оценки риска отторжения и ранней дисфункции трансплантатов печени : инструкция по применению : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 11.12.2015 / А. Е. Щерба, С. В. Коротков, Д. Ю. Ефимов, О. А. Лебедь, А. А. Коритко, А. И. Киреева, О. О. Руммо. – Минск, 2015. – 8 с.

Патенты

61. Способ консервации донорской печени : пат. ВУ 18509 / О. О. Руммо, А. Е. Щерба, С. В. Коротков, Ю. В. Слободин, И. И. Пикиреня, А. М. Дзядзько, А. Ф. Минов. – Опубл. 30.08.2014.

62. Способ подготовки донорской печени к трансплантации : пат. ВУ 19788 / А. Е. Щерба, О. О. Руммо, С. В. Коротков, А. Ф. Минов, А. М. Дзядзько, Д. Ю. Ефимов. – Опубл. 28.02.2016.

63. Способ оценки эффективности консервации трансплантата печени от донора с расширенными критериями : пат. ВУ 20198 / А. Е. Щерба, М. М. Савчук, С. В. Коротков, А. Ф. Минов, Е. О. Сантоцкий, А. М. Дзядзько, О. О. Руммо. – Опубл. 30.06.2016.

64. Способ периоперационного прогнозирования при трансплантации печени риска ранней дисфункции и острого отторжения трансплантата печени : пат. ВУ 21121 / А. Е. Щерба, О. О. Руммо, Д. Ю. Ефимов, С. В. Коротков, О. А. Лебедь, А. А. Коритко, А. Т. Киреева. – Оpubл. 30.06.2017.

Учебно-методические пособия

65. Трансплантация печени : учеб.-метод. пособие /Белорус. мед. акад. последиплом. образования ; О. О. Руммо, А. Е. Щерба, И. И. Пикиреня, С. В. Коротков, Ю. В. Слободин. – Минск : БелМАПО, 2010. – 52 с.

66. Анестезиологическое обеспечение трансплантации печени : учеб.-метод. пособие / Беларус. мед. акад. последиплом. образования ; А. М. Дзядзько, А. Е. Щерба, Л. С. Болонкин, А. Ф. Минов, Е. О. Сантоцкий. – Минск : БелМАПО, 2012. – 90 с.

РЭЗІЮМЭ

ШЧЭРБА Аляксей Яўгенавіч

Прагназаванне і комплекснае лячэнне
пасляаперацыйнай дысфункцыі трансплантата печані

Ключавыя словы: трансплантацыя печані, ішэмічна-рэперфузійнае пашкоджанне, ранняя дысфункцыя трансплантанта (РДТ), HMGB1, TLR-4, прэкандыцыянаванне, гепатапратэктцыя, рэтраградная кавальная реперфузія, севафлуран, такралімус.

Мэта даследавання: палепшыць вынікі трансплантацыі печані шляхам распрацоўкі і ўкаранення комплексу тэхналогій, накіраваных на прагназаванне, папярэджанне і карэкцыю ранняй дысфункцыі перасаджанага органа.

Метады даследавання і выкарыстаная апаратура: клінічны, матэматычны, імунагістахімічны, імунаферментны, статыстычны, секвеніруючая ПЦР-дыягностыка; мультіплексны аналізатар Luminex 200 (Luminex, ЗША), секвенатар 3500 GeneticAnalyzer (Lifetechnologies, ЗША), мікраскоп Leica Qwin DM LB, GeneRunner, version 3.0 and Primer3plus.

Атрыманыя вынікі і іх навізна. Абгрунтавана і вызначана прагнастычная роля імунагістахімічных (HMGB1, CD68, HIF-1 α) і сералагічных (HGF) маркераў ішэмічна-рэперфузійнага пашкоджання як прэдыктараў пасляаперацыйнай РДТ. Паказана патагенетычная роля палімарфізму гена патэрн-распазнаючага рэцэптара TLR-4 у локусе rs913930 у развіцці РДТ печані і яго сувязь з імунагістахімічнымі і сералагічнымі маркерамі пашкоджання печані. Распрацаваны метады прэкандыцыянавання донара з ужываннем інгаляцыйнага анестэтыка севафлуран і антыаксіданта N-ацэтыл-L-цыстэін. Абгрунтаваны і распрацаваны метады перфузіі раствора НТК і альбуміна, якія змяшчаюць такралімус, у варотную вену і пячоначную артэрыю падчас падрыхтоўкі донарскай печані да імплантацыі, які дазваляе паменшыць частату і выяўленасць РДТ печані. Распрацаваны метады рэтраграднай кавальнай реперфузіі, які спрыяе памяншэнню частоты агульнай і цяжкай РДТ печані.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: выкарыстоўваць ІГХ- (HMGB1, CD68, HIF-1 α), сералагічныя (HGF) і генетычныя (генатып гена TLR-4 ў локусе rs913930) маркеры для прагназавання РДТ печані. Для зніжэння рызыкі РДТ ўжываць метады прэкандыцыянавання донара, партальна-артэрыяльнай перфузіі з такралімусам і рэтраграднай кавальнай реперфузіі.

Вобласць ужывання: транспланталогія, гепаталогія.

РЕЗЮМЕ

ЩЕРБА Алексей Евгеньевич

Прогнозирование и комплексное лечение послеоперационной дисфункции трансплантатов печени

Ключевые слова: трансплантация печени, ишемически-реперфузионное повреждение, ранняя дисфункция трансплантата (РДТ), HMGB1, TLR-4, прекондиционирование, гепатопротекция, ретроградная кавальная реперфузия, севофлуран, такролимус.

Цель исследования: улучшить результаты трансплантации печени путем разработки и внедрения комплекса технологий, направленных на прогнозирование, предупреждение и коррекцию ранней дисфункции пересаженного органа.

Методы исследования и использованная аппаратура: клинический, математический, иммуногистохимический (ИГХ), иммуноферментный, статистический, секвенирующая ПЦР-диагностика; мультиплексный анализатор Luminex 200 (Luminex, США), секвенатор 3500 GeneticAnalyzer (Lifetechnologies, США), микроскоп Leica Qwin DM LB, GeneRunner, version 3.0 and Primer3plus.

Полученные результаты и их новизна. Обоснована и определена прогностическая роль ИГХ- (HMGB1, CD68, HIF-1 α) и серологических (HGF) маркеров ишемически-реперфузионного повреждения как предикторов послеоперационной РДТ. Показана патогенетическая роль полиморфизма гена паттерн-распознающего рецептора TLR-4 в локусе rs913930 в развитии РДТ печени и его связь с иммуногистохимическими и серологическими маркерами повреждения печени. Разработан метод прекондиционирования донора с применением ингаляционного анестетика севофлуран и антиоксиданта ацетилцистеин. Обоснован и разработан метод перфузии печени растворами НТК и альбумина, содержащими такролимус, через воротную вену и печеночную артерию во время подготовки донорской печени к имплантации, позволяющий уменьшить частоту и выраженность РДТ печени. Разработан метод ретроградной кавальной реперфузии, способствующий уменьшению частоты общей и тяжелой РДТ печени.

Рекомендации по использованию: использовать ИГХ- (HMGB1, CD68, HIF-1 α), серологические (HGF) и генетические (генотип гена TLR-4 в локусе rs913930) маркеры для прогнозирования РДТ печени. Для снижения риска РДТ применять методы прекондиционирования, портально-артериальной перфузии с такролимусом и ретроградной кавальной реперфузии.

Область применения: трансплантология, гепатология.

SUMMARY

SHCHERBA Aliaksei Yevgenievich

Prediction and comprehensive treatment of postoperative liver allograft dysfunction

Key words: liver transplantation, ischemic reperfusion injury, early allograft dysfunction (EAD), HMGB1, TLR-4, preconditioning, hepatoprotection, retrograde caval reperfusion, sevoflurane, tacrolimus.

Objective of the study: to improve the results of liver transplantation by the development and implementation of a range of technologies directed at the prediction, prevention and correction of the early dysfunction of the transplanted organ.

Methods of the study and equipment used: clinical, mathematical, statistical method of research, immunohistochemical and enzyme-linked immunosorbent assay, and sequencing PCR, real time PCR; multiplex analyzer Luminex 200 (Luminex, USA), 3500 Genetic Analyzer (Lifetechnologies, USA), microscope Leica Qwin DM LB, GeneRunner, version 3.0 and Primer3plus.

Obtained results and their novelty: The rational for immunohistochemical and serological markers of liver ischemic reperfusion injury was developed. The prognostic role of immunohistochemical (HMGB1, CD68, HIF-1 α) and serological (HGF) markers of ischemic-reperfusion injury as predictors of postoperative EAD is substantiated and determined. The pathogenic role of the pattern-recognition receptor TLR-4 gene in the rs913930 locus in the development of liver EAD and its association with immunohistochemical and serological markers of liver injury is shown. A method for preconditioning of a donor using an inhalation anaesthetic sevoflurane and an antioxidant N-acetyl-L-cysteine was developed and implemented. The method of perfusion of the liver with HTK solution and albumin both containing tacrolimus into the portal vein and hepatic artery during preparation of the donor liver for implantation, which allows to decrease the frequency and severity of EAD, is substantiated and developed. A method of retrograde caval reperfusion has been developed that contributes to lower frequency of total and severe forms of EAD.

Recommendations for the use: use IGH-(HMGB1, CD68, HIF-1 α), serological (HGF) and genetic (TLR-4 gene genotype in rs913930 locus) markers for prediction of EAD of the liver. Use methods of a preconditioning, portal and arterial perfusion with tacrolimus and retrograde caval reperfusion of the liver to decrease the risk of EAD.

Field of implementation: liver transplantation, hepatology.

Подписано в печать 21.05.18. Формат 60×84/16. Бумага писчая «Снегурочка».
Ризография. Гарнитура «Times».
Усл. печ. л. 1,39. Уч.-изд. л. 1,3. Тираж 60 экз. Заказ 241.

Издатель и полиграфическое исполнение: учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/187 от 18.02.2017.
Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.